



植物乳杆菌 (LP HMX-3) 对仿刺参生长、消化、免疫和肠道菌群的影响

王梦美¹, 吕成杰², 杨顶珑^{2*}, 赵建民²

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探究植物乳杆菌 LP HMX-3 对仿刺参生长性能、消化酶活性、免疫能力和肠道菌群的影响, 选择初始体重为 (4.22 ± 0.05) g 的仿刺参, 随机分为对照组 (C 组) 和 LP HMX-3 添加组即 10^5 CFU/g 的 LL 组和 10^7 CFU/g 的 LM 组, 进行为期 8 周的养殖实验。结果显示, ①LP HMX-3 显著提高了仿刺参的终体重、增重率以及特定生长率, 且 LL 组的生长指标更优; ②LL 组的肠道淀粉酶和 LM 组的肠道脂肪酶活性显著高于 C 组, 说明 LP HMX-3 可能提高仿刺参的消化利用率; ③LL 组和 LM 组体腔液的碱性磷酸酶和过氧化氢酶活性以及 LM 组的酸性磷酸酶活性均显著高于 C 组, 此外, LL 组和 LM 组体腔细胞 *Aj-p105* 和 *Aj-catalase* 表达量以及 LM 组的 *Aj-C3* 表达量显著高于 C 组, 说明 LP HMX-3 可增强仿刺参的免疫力; ④由 16S *rDNA* V4 区测序可知, α 多样性指数显示, LP HMX-3 显著提高了仿刺参肠道微生物丰富度和均匀度, 但 LL 组和 LM 组差异不大; β 多样性分析显示, LL 组和 LM 组的微生物种群结构相似, 但明显不同于 C 组; ⑤在门水平上, LL 组和 LM 组变形菌门丰度显著低于 C 组, LL 组厚壁菌门丰度以及 LL 组和 LM 组拟杆菌门、蓝藻门和 *Campilobacterota* 丰度显著高于 C 组, 属水平上, LL 组和 LM 组乳杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属和梭菌属的丰度高于 C 组, 说明 LP HMX-3 显著提高了仿刺参潜在益生菌的丰度。上述结果表明, 饲料中添加植物乳杆菌 LP HMX-3 可以促进仿刺参的生长, 在一定程度上提高仿刺参的消化能力、增强免疫力, 并能积极调节肠道微生物菌群。综上, 本研究可为益生菌在水产养殖中的应用提供技术支持和科学依据, 并为水产养殖病害防治提供新的思路。

关键词: 仿刺参; 植物乳杆菌; 生长性能; 消化酶; 免疫能力; 肠道微生物

中图分类号: S 917

文献标志码: A

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea), 具有食用和药用双重价值^[1], 是我国北方重要的海水养殖经济物种^[2]。近年来, 腐皮综合征等疾病暴发严重阻碍了仿刺参养殖业的健康可持续发展。

一般而言, 抗生素和化学药物是防控病害的重要手段, 但过度使用抗菌药物往往导致病原菌的进化、药物残留以及环境污染问题, 大大增加了人类的健康风险^[3]。作为病害防控的重要手段, 益生菌因其具有无毒、无抗药性、无残留等特点,

收稿日期: 2021-09-23 修回日期: 2021-11-04

资助项目: 中国科学院战略性先导研究计划 (XDA23050303); 国家自然科学基金 (41806196); 山东省自然科学基金 (ZR2019BD022); 烟台市科技发展计划项目 (2020MSGY066)

第一作者: 王梦美 (照片), 从事益生菌的筛选与应用研究, E-mail: 1819988702@qq.com

通信作者: 杨顶珑, 从事贝类生理学与免疫学研究, E-mail: dlyang@yic.ac.cn



可作为一种环境友好的饲料添加剂, 广泛应用于仿刺参的养殖业中。

根据 FAO/WHO 组织的定义, 益生菌是一种在合适剂量对宿主健康有益的活性微生物。其中, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 是一种杆状、革兰氏阳性、不形成芽孢的兼性厌氧益生菌, 能产生一些活性物质, 从而改善水产动物的生长性能^[4]。例如, 其代谢产生的有机酸、细菌素、过氧化氢等物质可抑制病原菌的生长^[5], 并通过竞争性抑制作用阻碍病原体在肠上皮上的黏附^[6]。目前, 已有关于植物乳杆菌在鱼类和甲壳类水产动物中的益生作用研究。在细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) 中, 植物乳杆菌能显著增加细鳞鲑的特定生长率, 有效促进其生长^[7]; 夏雨等^[6]通过琼脂扩散法、荧光染色法与分光光度法筛选, 发现 3 株植物乳杆菌均对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的致病菌有抑制作用, 并通过有效黏附于对虾肠黏液抑制病原菌的生长和定殖。此外, 植物乳杆菌还能增强水产动物的非特异性免疫反应, 并积极调节肠道微生态平衡。例如, Van Nguyen 等^[8]将热灭活的植物乳杆菌菌株 L-137 添加于尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 饲料中投喂尼罗罗非鱼, 发现鱼体内头肾细胞的吞噬活性和血清中溶菌酶活性显著提高; Zheng 等^[9]研究发现, 植物乳杆菌无细胞提取物和发酵上清液能积极调节凡纳滨对虾的肠道微生物菌群, 具有较好的益生潜力。上述研究显示, 植物乳杆菌具有促进生长、提高免疫和调节肠道微生态的作用, 在水产养殖中具有较大的应用潜力。然而, 植物乳杆菌对仿刺参的益生作用和机制鲜有报道。

本实验室前期从仿刺参肠道中分离获得一株植物乳杆菌, 命名为 LP HMX-3。通过体外实验证明其具有一定的抑菌活性和耐盐性, 可在 30 的盐度下生长。在本实验中, 通过在饲料中添加不同浓度 (10^5 和 10^7 CFU/g) 的 LP HMX-3, 研究其对仿刺参生长性能、消化酶活性、免疫能力和肠道菌群的影响, 以明确植物乳杆菌在仿刺参体内的益生效果及较优添加量, 并为植物乳杆菌在刺参养殖中的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用仿刺参幼参购自烟台市牟平区某养殖场, 实验开始前, 将仿刺参置于 (17 ± 2) °C 的海

水循环系统中暂养 2 周以适应环境。暂养期间保持溶氧在 5 mg/L 以上, 每日换水后投喂基础饲料 (烟台蓬安源海洋食品有限公司) 和海泥, 饲料日投喂量为仿刺参体重的 2%~3% (不含海泥)。

实验所用 LP HMX-3 为本实验室保藏菌株, 从仿刺参肠道中筛选获得, 经 16S *rDNA* 测序鉴定其为植物乳杆菌。将保种的 LP HMX-3 按 2% 的比例接种到 MRS 培养基中, 28 °C 静置培养 24 h 后逐级扩大培养。4 °C, 4 000 r/min 离心 10 min 分钟, 收集菌体。用无菌生理盐水冲悬, 调整至 $OD_{600}=1$, 采用平板计数法^[9] 计算浓度, 逐级稀释至 10^7 和 10^5 CFU/mL 后添加到仿刺参饲料中。含菌饵料现配现用。

1.2 实验设计

仿刺参暂养 2 周后, 挑选健康、体重差异较小的幼参 [(4.22 ± 0.05) g] 随机分散到 9 个玻璃缸 (160 L) 中, 每缸 30 头。实验设置 1 个对照组 C 组 (0 CFU/g) 和 2 个处理组 LL 组 (10^5 CFU/g)、LM 组 (10^7 CFU/g), 每组 3 个重复。养殖实验共进行 8 周, 期间每天换水 1 次, 每次 1/3~1/2 水量, 并吸除残饵和粪便以及记录仿刺参健康状况, 每 2 周测定仿刺参生长指标。

1.3 样品采集

养殖实验结束后, 停食 24 h。捞取每缸全部的仿刺参, 分别记录总数并称重, 计算增重率 (weight gain rate, WGR)、特定生长率 (specific growth rate, SGR) 和存活率 (survival rate, SR) 等。从 C、LL 和 LM 组的每个平行取 10 头仿刺参用于样品采集。使用无菌注射器自仿刺参腹腔抽取体腔液 10 mL, 并经双层 300 目筛绢过滤。其中, 2 mL 体腔液于 4 °C、800 r/min 下离心 10 min 收集体腔细胞, 并加入 1 mL RNAiso Plus (TaKaRa, 日本), 用于测定免疫相关基因表达量, 每组 4 个平行; 剩余体腔液用于免疫酶活性测定, 每组 6 个平行。此外, 收集仿刺参肠道组织, 用无菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 冲洗后用滤纸吸干, 用于消化酶活测定, 每组 6 个平行。同时, 收集仿刺参肠道, 用于肠道菌群的测定, 每组 5 个平行。样品经液氮速冻后, 均保存于 -80 °C 待测。

1.4 指标测定

生长性能测定 存活率 (SR, %) = $N_i / N_0 \times 100\%$;

增重率 (WGR, %) = $(W_i - W_0) / W_0 \times 100\%$;

特定增长率 (SGR, %/d) = $(\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$ 。

式中, N_t 是饲养实验结束时存活的仿刺参数量 (头), N_0 是饲养实验中仿刺参的初始数量; W_t 和 W_0 分别为仿刺参的最终体重和初始体重 (g); t 为养殖实验进行的天数 (d)。

酶活性测定 使用南京建成生物工程研究所的试剂盒 (A060-2-2、A059-1-1、A001-1-2、A007-1-1、C016-1-1、A080-2-2 和 A054-2-1) 分别测定仿刺参体腔液中酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性以及肠道中淀粉酶 (AMS)、胰蛋白酶 (TRP) 和脂肪酶 (LPS) 的活性; 采用碧云天生物技术有限公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012) 测定蛋白浓度。

免疫相关基因表达量的测定 采用 TRIzol 法提取仿刺参体腔细胞的总 RNA, 用 0.1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo, 美国) 检测 RNA 完整性和纯度。以 RNA 为模板反转录合成 cDNA。基于 ABI 7500 基因定量实时检测系统 (Thermo Fisher 公司, 美国), 采用 SYBR green I 方法测定免疫基因 *Aj-p105*、*Aj-C3*、*Aj-catalase* 的相对表达量 (表 1)。定量 PCR 的反应体系为 20 μ L, 其中各 0.4 μ L 的上下游引物 (10 μ mol/L)、6 μ L 模板、10 μ L SYBR Mix I 和 3.2 μ L 的 DEPC 水。反应程序为 50 $^{\circ}$ C 20 s, 95 $^{\circ}$ C 7 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测目的基因的相对表达量。

表 1 内参和目的基因定量引物

| 目的基因 genes | 引物名称 primer name | 序列 (5'-3') primer sequences(5'-3') |
|---------------------------------|------------------|------------------------------------|
| <i>β-actin</i> | actin-F | TTATGCTCTTCCTCAGCTATCC |
| | actin-R | TTGTGGTAAAGGTGTAGCCTCTCTC |
| <i>Aj-p105</i> | p105-F | GCAACACACCCCTCCATCTT |
| | p105-R | TCTTCTTCGCTAACGTCACACC |
| <i>Aj-catalase</i> | catalase-F | TCCTCGTGGATTTGCCGTGAAGTTC |
| | catalase-R | GAGTCACTGGGTTCCTCTTCTGGGT |
| <i>Aj-C3</i> | C3-F | GCGTGTGTTTCGTTCAACAAGGGGA |
| | C3-R | GCCATTCACGTGAGGTGTGGCA |

肠道微生物检测 使用 FastDNA SPIN Kit for Feces(MP Biomedical) 试剂盒提取仿刺参肠道

微生物的总 DNA。使用引物 515F(5'-GTGCCA GCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 16S *rDNA* 的 V4 区。用 1% 琼脂糖凝胶电泳将扩增获得的 PCR 产物进行检测并切胶回收, 精确定量后在 Novogene 的 Illumina MiSeq 平台上进行测序并分析。具体过程参照唐杨等^[10] 进行。

1.5 统计分析

实验结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。通过统计软件 SPSS 26.0 对实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当不同处理组差异显著 ($P < 0.05$) 时, 采用 Duncan 氏法作多重比较分析。本研究获得了宁波大学实验动物中心批准, 实验过程中操作人员严格遵守 GBT2018 伦理规范, 并按照宁波大学实验动物中心制定的规章制度执行。

2 结果

2.1 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参生长性能的影响

饲喂不同浓度的 LP HMX-3 对仿刺参生长指标和存活的影响结果显示, 养殖实验结束后, 所有组的仿刺参存活率没有显著差异 ($P > 0.05$); LL 组和 LM 组的终体重、增重率以及特定增长率均显著高于 C 组 ($P < 0.05$), 且 LL 组的生长指标高于 LM 组, 但 LL 组和 LM 组之间没有显著差异 ($P > 0.05$)(表 2)。由结果可以看出, 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参的生长具有显著的促进作用, 添加浓度对仿刺参生长影响不大。

表 2 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参生长性能的影响

| 指标 indexes | 组别 groups | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | C | LL | LM |
| 初体重/g initial body weight | 4.18 \pm 0.03 | 4.27 \pm 0.05 | 4.22 \pm 0.02 |
| 终体重/g final body weight | 6.19 \pm 0.09 ^b | 7.20 \pm 0.42 ^a | 6.88 \pm 0.16 ^a |
| 增重率/% WGR | 48.18 \pm 2.80 ^b | 68.45 \pm 8.58 ^a | 63.34 \pm 4.66 ^a |
| 特定增长率%/d SGR | 0.70 \pm 0.03 ^b | 0.93 \pm 0.09 ^a | 0.88 \pm 0.05 ^a |
| 存活率/% SR | 93.33 \pm 3.33 | 93.33 \pm 0.00 | 93.33 \pm 6.67 |

注: 同行不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); 下同。
Notes: Different superscripts in the same line indicate significant difference ($P < 0.05$); the same below.

2.2 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参肠道消化酶活性的影响

LM 组肠道的脂肪酶活性显著高于 LL 组和 C 组 ($P < 0.05$); LL 组的淀粉酶活性最高, 且显著高于 LM 组和 C 组 ($P < 0.05$); 各组之间的胰蛋白酶活性没有显著差异 ($P > 0.05$)(表 3)。结果表明, 饲料中添加 LP HMX-3 有助于提高仿刺参肠道中的消化酶活性。

表 3 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参肠道消化酶活性的影响

Tab. 3 Effects of LP HMX-3 supplementation on digestive enzyme activity of intestine of *A. japonicus*

| 指标 indexes | 组别 groups | | |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | C | LL | LM |
| 脂肪酶/(U/g prot) LPS | 1.13±0.13 ^b | 1.10±0.19 ^b | 2.69±0.22 ^a |
| 淀粉酶/(U/mg prot) AMS | 0.46±0.072 ^b | 0.62±0.10 ^a | 0.45±0.089 ^b |
| 胰蛋白酶/(U/mg prot) TRP | 1269.02±122.75 | 1285.49±239.87 | 1394.59±455.75 |

2.3 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参体腔液免疫相关酶活性的影响

饲喂不同浓度的 LP HMX-3 可以不同程度的提高仿刺参非特异性免疫酶活性(表 4)。LL 组和 LM 组体腔液的碱性磷酸酶活性显著高于 C 组 ($P < 0.05$), 但 LL 组和 LM 组之间没有显著差异 ($P > 0.05$); LM 组的酸性磷酸酶活性显著高于 C 组 ($P < 0.05$), LL 组和 LM 组的差异不显著 ($P > 0.05$); 各组的超氧化物歧化酶活性没有显著差异 ($P >$

表 4 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参体腔液免疫酶活性的影响

Tab. 4 Effects of LP HMX-3 supplementation on immune enzyme activity of coelomic fluid of *A. japonicus*

| 指标 indexes | 组别 groups | | |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | C | LL | LM |
| 碱性磷酸酶/(U/100 mL) AKP | 0.38±0.069 ^b | 0.74±0.098 ^a | 0.72±0.092 ^a |
| 酸性磷酸酶/(U/100 mL) ACP | 0.78±0.17 ^b | 1.01±0.31 ^{ab} | 1.10±0.12 ^a |
| 超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD | 106.18±5.22 | 94.82±18.59 | 104.22±18.50 |
| 过氧化氢酶/(U/mL) CAT | 6.80±0.69 ^c | 27.17±0.22 ^a | 24.30±0.63 ^b |

0.05); LL 组的过氧化氢酶活性最高, 其次是 LM 组, 2 组之间差异显著且均显著高于 C 组 ($P < 0.05$)。

2.4 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参体腔细胞中免疫相关基因表达量的影响

饲料中添加 LP HMX-3 可以不同程度的提高仿刺参体腔细胞中免疫相关基因表达量。其中, LL 组和 LM 组中体腔细胞 *Aj-p105* 表达量显著高于 C 组 ($P < 0.05$), LL 组和 LM 组之间没有显著差异 ($P > 0.05$); LL 组中仿刺参体腔细胞 *Aj-catalase* 基因表达水平最高, 其次是 LM 组, 2 组之间差异显著且均显著高于 C 组 ($P < 0.05$)。LL 组和 LM 组中仿刺参体腔细胞 *Aj-C3* 基因表达水平高于 C 组, 且 LM 组与 C 组差异显著 ($P < 0.05$)(图 1)。

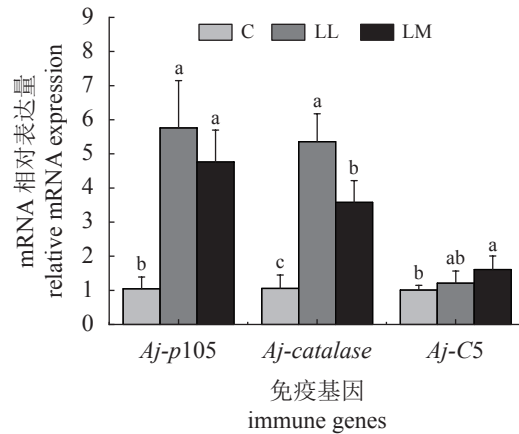


图 1 饲料中添加 LP HMX-3 对仿刺参体腔细胞免疫相关基因表达量的影响

不同处理组间不同上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of LP HMX-3 supplementation on the expression of immune-related genes in coelomic cells of *A. japonicus*

Different letters between different treatments indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.5 肠道菌群分析

α 多样性分析 从仿刺参肠道样本中获得的有效序列为 61 308~69 999 条, 经过进一步的分析, 可将其归为 1 649~5 574 个操作分类单元 (OTUs)。仿刺参肠道菌群的 α 多样性以 Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、PD_{whole_tree} 方法进行评估。结果显示, LL 组和 LM 组的 Observed-species、Chao1、ACE 和 PD_{whole_tree} 指数均显著高于 C 组 ($P < 0.05$), 而且 LL 组大于 LM 组, 但 2 组之间没有显著差异 ($P >$

0.05); LL组和LM组的Shannon、Simpson指数高于C组, 但各组之间没有显著差异 ($P>0.05$)。α多样性结果表明, LL和LM组肠道中的微生物丰富度和均匀度都高于C组, 且LL组略高于LM组(表5)。

β多样性分析 主坐标分析(PCoA)可以用来指示不同样本的群落变化。基于加权的Unifrac距离的PCoA和非加权的Unifrac距离的PCoA表明, LL组和LM组的仿刺参肠道菌群相似, 均与C组不同(图2)。聚类分析也显示了相似的趋势, 基于加权的Unifrac距离矩阵和非加权的Unifrac距离矩阵的UPGMA聚类分析可以看出, LL和LM聚为一个分支, 然后与C组聚为一支,

表5 饲料中添加LP HMX-3对仿刺参肠道菌群α多样性的影响

Tab. 5 Effects of LP HMX-3 supplementation on α diversity of intestinal flora of *A. japonicus*

| 指标 indexes | 组别 groups | | |
|------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | C | LL | LM |
| observed_species | 630.40±157.69 ^b | 2 268.40±1 017.63 ^a | 1 910.80±1 087.39 ^a |
| Shannon | 4.34±0.81 | 6.62±2.05 | 6.22±1.61 |
| Simpson | 0.87±0.055 | 0.90±0.11 | 0.93±0.021 |
| Chao1 | 760.23±182.20 ^b | 2 623.30±1 097.47 ^a | 2 215.65±1 159.34 ^a |
| ACE | 807.78±197.85 ^b | 2 711.77±1 101.59 ^a | 2 349.19±1 226.85 ^a |
| PD_whole_tree | 77.34±18.55 ^b | 212.68±90.41 ^a | 179.84±87.45 ^a |

表明LL组与LM组中的细菌群落相似性高于C组(图3)。由Venn图可知, 各组的仿刺参肠道样本中共有的OTU有726个, LL组特有的OUT数量最多(1 564个), 其次是LM组(1 203个), 最少的为C组(690个)。β多样性分析结果显示, LL组和LM组的物种组成结构相似且菌群多样性高于C组。肠道菌群的多样性分析表明饲料中添加LP HMX-3有助于提高仿刺参肠道菌群的菌落多样性, 添加量对其菌群多样性和丰富度影响不大。

肠道细菌群落组成 仿刺参肠道微生物可归于79个门类、151个纲、327个目、498个科、1 116个属。门水平上, 在所有组中, 变形菌门(Proteobacteria)的丰度最高, 其次是厚壁菌门(Firmicutes)。变形菌门的丰度在C组最高, 其次是LM组, 且C组与LL组和LM组有显著差异 ($P<0.05$); 厚壁菌门的丰度在LL组最高, 且与C组有显著差异 ($P<0.05$), 其次是LM组; 而LL组和LM组拟杆菌门(Bacteroidota)、蓝藻门(Cyanobacteria)和Campilobacterota的丰度显著高于C组 ($P<0.05$), 但在2个处理组中没有显著差异 ($P>0.05$)。另外, LL组和LM组放线菌门(Actinobacteriota)以及酸杆菌门(Acidobacteriota)的丰度高于C组(图4, 表6)。属水平上, 与对照组相比, LL组和LM组中潜在的益生菌相关属的丰度增加, 包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆

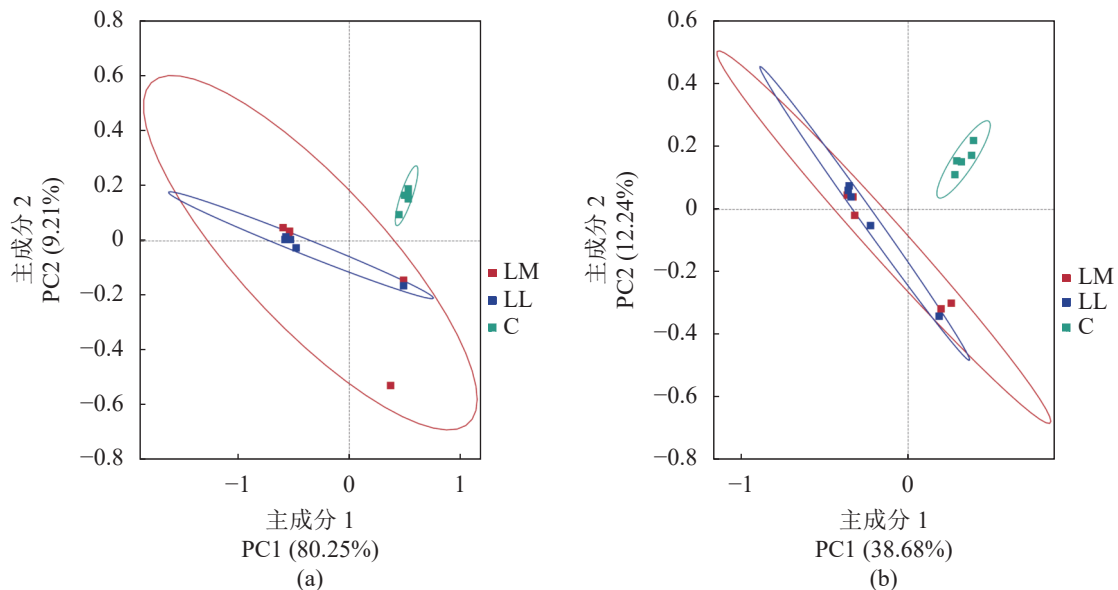


图2 仿刺参肠道细菌群落结构的主坐标分析 (a) 基于加权 Unifrac 距离 (b) 基于未加权 Unifrac 距离

Fig. 2 Principal Co-ordinates Analysis (PCoA) of the bacterial community from *A. japonicus* intestine (a) based on weighted Unifrac distance (b) based on unweighted Unifrac distance

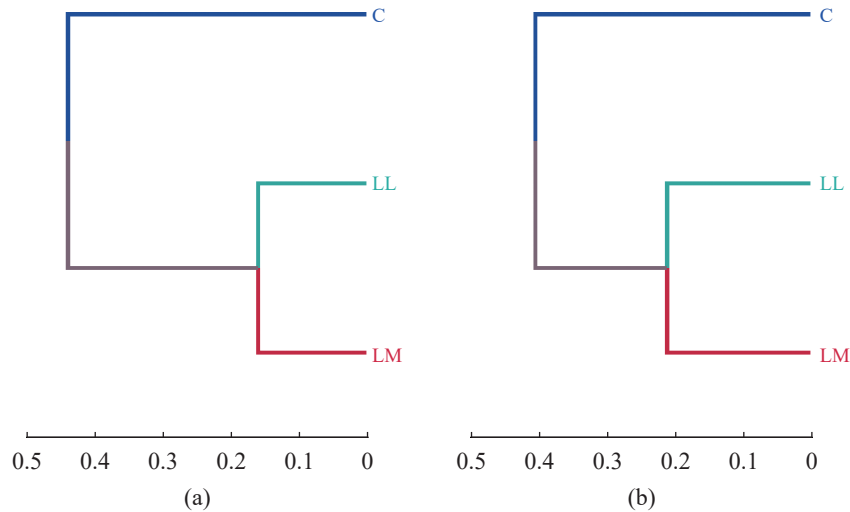


图3 仿刺参肠道细菌群落的UPGMA聚类树 (a) 基于加权 Unifrac 距离 (b) 基于未加权 Unifrac 距离
树枝长度代表样本间的距离。

Fig. 3 UPGMA clustering tree of the bacterial community from *A. japonicus* intestine (a) based on weighted Unifrac distance (b) based on unweighted Unifrac distance

The branch length represents the distance between samples.

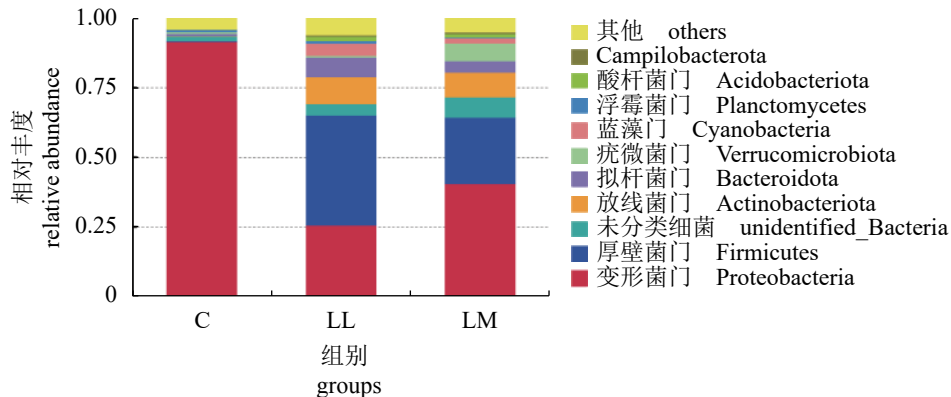


图4 仿刺参肠道中门水平上的物种相对丰度柱形图

Fig. 4 Column chart of relative species abundance at the phylum level of *A. japonicus* intestine

菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)(图5)。

3 讨论

益生菌作为抗生素的替代品被广泛应用于水产养殖业, 其具有改变宿主或相关环境微生物群落的潜力, 并可通过提高饲料利用率、生长、免疫状态和存活等方式对宿主产生有益影响^[11-13]。

在本研究中, 饲料中添加 10^5 和 10^7 CFU/g 的植物乳杆菌 LP HMX-3 有助于提高仿刺参的生长性能, 且 10^5 CFU/g 的添加量具有更优的效果。这一结果与以往在仿刺参^[13] 和尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*)^[14-15] 中的研究结果具有一定的差异性。在仿刺参中, Li 等^[13] 发现 2 株海水鱼源乳酸菌可

显著提高海参的生长性能, 其添加量为 10^9 CFU/g, 研究结果的差异可能与菌种的来源、菌的添加量等因素有关。一般而言, 植物乳杆菌可通过产生氨基酸和维生素等营养物质, 作为养殖生物的营养增强剂。另一方面, 植物乳杆菌能够刺激机体细胞分泌消化酶类, 帮助水产动物加强对营养物质的利用^[16-18]。本研究显示, 仿刺参饲料中添加 LP HMX-3 之后, 在一定程度上提高了机体淀粉酶和脂肪酶的活性, 提高了仿刺参对饲料的消化吸收利用率。

作为海洋无脊椎动物, 仿刺参缺乏获得性免疫, 主要依靠先天免疫系统来抵御病原侵袭。以往研究表明, AKP、ACP、SOD 和 CAT 在棘皮动物的免疫防御中起重要作用^[19-20], 其中, ACP 和

表 6 仿刺参肠道中门水平上的优势菌群分布

Tab. 6 Distribution of dominant microflora at the phylum level of *A. japonicus* intestine

| 门 phylum | 组别 groups | | |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | C | LL | LM |
| 变形菌门 Proteobacteria | 0.9147±0.0230 ^a | 0.2574±0.2468 ^b | 0.4057±0.2225 ^b |
| 厚壁菌门 Firmicutes | 0.0032±0.0015 ^b | 0.3935±0.2758 ^a | 0.2376±0.2141 ^{ab} |
| unidentified_Bacteria | 0.0179±0.0096 | 0.0413±0.0159 | 0.0729±0.0907 |
| 放线菌门 Actinobacteriota | 0.0012±0.0003 | 0.0965±0.0778 | 0.0891±0.0829 |
| 拟杆菌门 Bacteroidota | 0.0080±0.0056 ^b | 0.0702±0.0588 ^a | 0.0409±0.0224 ^a |
| 疣微菌门 Verrucomicrobiota | 0.0065±0.0046 | 0.0064±0.0091 | 0.0632±0.0838 |
| 蓝藻门 Cyanobacteria | 7.7E-05±0.0001 ^b | 0.0434±0.0417 ^a | 0.0195±0.0277 ^a |
| 浮霉菌门 Planctomycetes | 0.0073±0.0035 | 0.0097±0.0208 | 0.0026±0.0039 |
| 酸杆菌门 Acidobacteriota | 0.0006±0.0003 | 0.0163±0.0124 | 0.0123±0.0098 |
| Campilobacterota | 0.0009±0.0007 ^b | 0.0049±0.0031 ^a | 0.0068±0.0040 ^a |

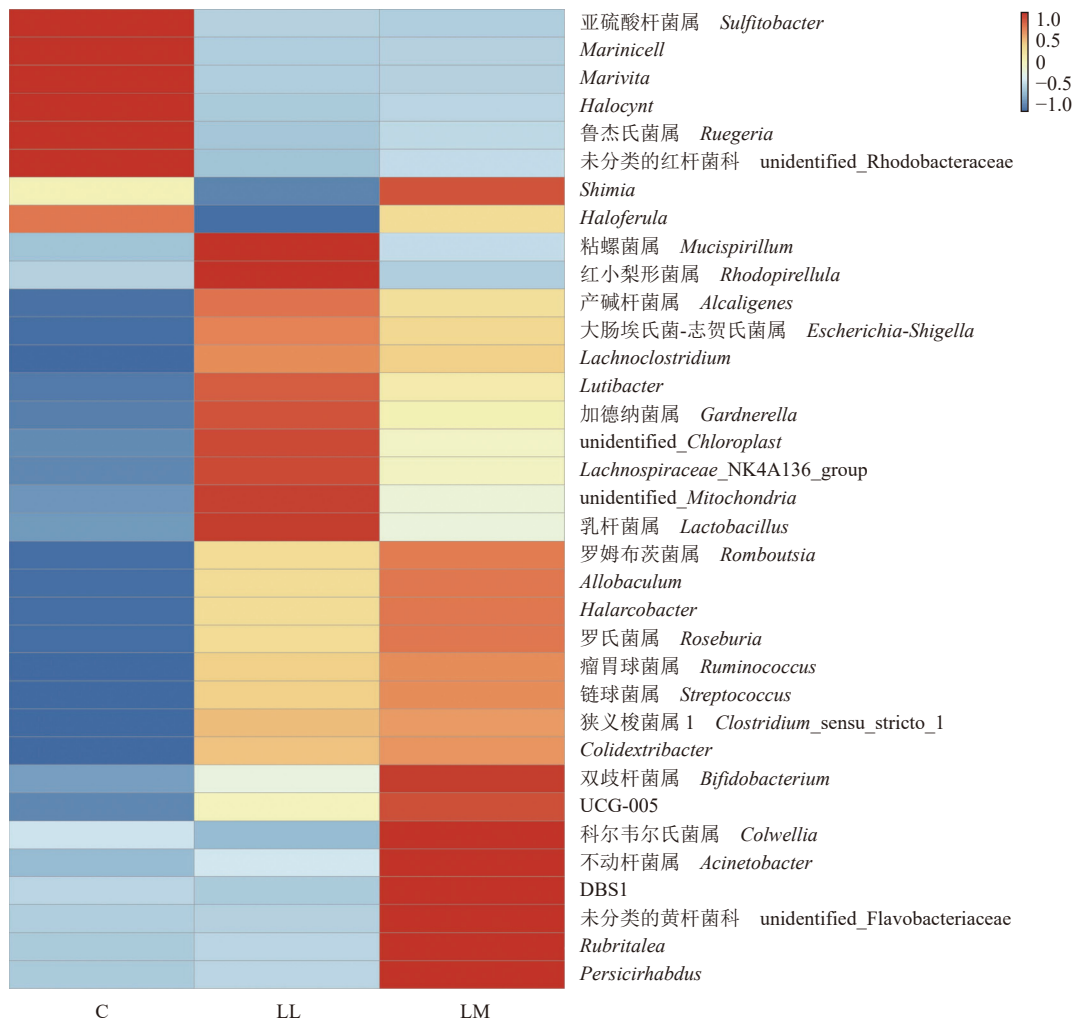


图 5 仿刺参肠道中属水平上的物种丰度热图

Fig. 5 Heatmap analysis of the species abundance at the genus level in the gut of *A. japonicus*

AKP 能杀死和消化微生物和外来物质。在本研究中, 投喂了含植物乳杆菌 LP HMX-3 的仿刺参 AKP 和 ACP 活性均有不同程度的提高, 这与 Li 等^[13]、Yang 等^[19] 和宫魁等^[21] 对海参的研究报道相似。值得注意的是, 机体免疫活性的高低与益生菌的添加水平存在关联性。例如, AKP 活性在 10^5 CFU/g 添加组最高, 而 ACP 活性在 10^7 CFU/g 添加组最高, 这说明免疫力的高低与益生菌的种类和添加量密切相关。此外, SOD 和 CAT 是 2 种抗氧化酶, 是机体抗氧化防御系统重要的组成部分^[22-23], 其在防止细胞损伤和衰老方面亦起着关键作用^[19]。在本研究中, 仿刺参饲料中添加植物乳杆菌 LP HMX-3 后, CAT 活性显著升高, SOD 水平没有显著变化。这可能是因为 H_2O_2 作为 SOD 的作用产物, 其可能会抑制 SOD 水平^[24], 而对 CAT 活性有刺激作用^[25]。以上结果可能预示了 LP HMX-3 对仿刺参具有重要的免疫调控作用。在仿刺参中, p105^[26]、catalase^[27]、补体成分 3^[28] 是重要的细胞免疫因子, 在免疫防御系统中发挥着重要作用。例如, 张斯等^[29] 发现 *Aj-C3* 在仿刺参体腔细胞中的表达量最高, 可能是补体系统中含量较高、较为核心的成员。在本研究中, 添加植物乳杆菌后, 仿刺参的 *Aj-p105*、*Aj-catalase* 和 *Aj-C3* 表达量升高, 说明 LP HMX-3 在一定程度上增强了仿刺参的免疫力。另外, 有人认为植物乳杆菌细胞壁中的肽聚糖可能有助于机体免疫刺激^[30], 动物肠道中的有益菌群也能刺激免疫细胞分化, 激活免疫系统, 从而增强宿主的免疫力, 促进机体健康生长^[31]。

肠道菌群结构和功能对仿刺参生长具有重要意义, 与仿刺参的营养代谢和免疫防御等^[32] 生理过程密切相关。其中, 肠道微生物多样性起着重要作用, 多样性降低表明肠道微生物群落稳定性变差, 养殖生物患病风险增大, 朱文根等^[33] 研究结果显示, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 呼肠孤病毒感染组的 Shannon 指数、Simpson 指数以及 Pielou 均匀度显著低于对照组。黄学敏等^[34] 同样发现, 凡纳滨对虾健康苗池的 Shannon 指数和 Pielou 均匀度均显著高于发病苗池, 表明更高的菌群 α 多样性有利于水体环境稳定和虾幼体健康, 反之可能易造成幼体发病。在本研究中, 10^5 CFU/g 组和 10^7 CFU/g 组的 Observed-species、Chao1、ACE 和 PD_whole_tree 等 α 多样性指标显著高于对照组, 这表明饲料中添加植物乳杆菌 LP HMX-

3 显著提高了仿刺参肠道菌群的丰富度和均匀度。在仿刺参缺乏特异性免疫的情况下, 较高的 α 多样性可能代表着其对病原菌的高抗性和对养殖环境的适应性。同时, β 多样性分析发现, 植物乳杆菌 LP HMX-3 添加组的微生物群落结构发生了明显变化, 这表明添加的益生菌--植物乳杆菌 LP HMX-3 是影响肠道菌群的关键因素。添加 LP HMX-3 后, 10^5 CFU/g 组和 10^7 CFU/g 组的特有 OUT 增多, 且 10^5 CFU/g 组多于 10^7 CFU/g 组, 该结果表明, 将仿刺参暴露于不同浓度的益生菌会改变其内在的微生物种群结构^[35]。其中, 最占优势的门是变形菌门, 其次是厚壁菌门, 这与 Foyisal 等^[36] 的研究结果相似。众所周知, 变形菌门细菌广泛分布于海洋环境中, 但其在肠道中大量出现可反映肠道微生物群落结构的失调或不稳定, 存在诱发炎症反应风险^[37], 而厚壁菌门是肠道中的一个优势门, 同时是指示肠道健康的良好指标^[38]。在添加 LP HMX-3 后, 仿刺参肠道微生物群中变形菌门的丰度显著降低, 厚壁菌门丰度显著升高, 初步表明植物乳杆菌 LP HMX-3 可以积极调节肠道菌群结构, 维持仿刺参体内的稳态。Yang 等^[39] 通过分子生态网络分析也发现益生菌可以促进海参肠道菌群稳态。此外, 投喂植物乳杆菌 LP HMX-3 饲料的仿刺参体内拟杆菌门的丰度显著高于对照组。由于拟杆菌门可以参与营养物质的代谢, 产生多种多糖水解酶^[40], 说明植物乳杆菌 LP HMX-3 可能促进了仿刺参对营养物质的消化利用率, 促进了仿刺参的生长性能。另外, 投喂植物乳杆菌饲料的仿刺参肠道内放线菌门以及酸杆菌门的丰度也有所增加。放线菌门在维持和发展肠道内稳态、调节肠道通透性以及免疫系统和代谢中起着关键作用^[41], 酸杆菌门的细菌成员能产生抗菌物质, 或有利于提高仿刺参的免疫状态和抗病能力^[42]。

综上所述, 饲料中添加植物乳杆菌 LP HMX-3 可以促进仿刺参的生长, 提高体内消化酶活性, 并积极调节仿刺参的免疫机能与肠道微生物菌群结构。从仿刺参生长的角度来讲, 10^5 CFU/g 的添加浓度具有较优的效果。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 王际英, 李宝山, 张德瑞, 等. 饲料中添加精氨酸对仿

- 刺参幼参生长、免疫能力及消化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 410-420.
- Wang J Y, Li B S, Zhang D R, *et al.* Effects of dietary arginine on growth performance, immune responses and digestive enzyme of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 410-420 (in Chinese).
- [2] 孙圆圆, 袁志星, 薛晓蕾. 中国海参产业发展问题与对策研究[J]. 世界农业, 2018(3): 186-191.
- Sun Y Y, Yuan Z X, Xue X L. Research on the problems and countermeasures of China's sea cucumber industry development[J]. World Agriculture, 2018(3): 186-191 (in Chinese).
- [3] Cabello F C, Godfrey H P, Buschmann A H, *et al.* Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(7): e127-e133.
- [4] Wang L, Zhou H H, He R J, *et al.* Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 87-94.
- [5] Servin A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(4): 405-440.
- [6] 夏雨, 范荣波, 易华西, 等. 植物乳杆菌对凡纳滨对虾致病菌抑制及其对肠道菌群结构的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2020, 50(10): 37-46.
- Xia Y, Fan R B, Yi H X, *et al.* Inhibition of *Lactobacillus plantarum* on pathogenic bacteria in *Litopenaeus vannamei* culture and its effect on intestinal flora[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(10): 37-46 (in Chinese).
- [7] 胡宗福, 牛化欣, 于建华, 等. 饲料中添加植物乳杆菌对细鳞鲑生长及肠道菌群多样性的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(1): 346-356.
- Hu Z F, Niu H X, Yu J H, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* supplementation on growth and intestinal microbial flora diversity of *Brachymystax lenok*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1): 346-356 (in Chinese).
- [8] Van Nguyen N, Onoda S, Van Khanh T, *et al.* Evaluation of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 371-379.
- [9] Zheng X T, Duan Y F, Dong H B, *et al.* The effect of *Lactobacillus plantarum* administration on the intestinal microbiota of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735331.
- [10] 唐杨, 刘文亮, 宋晓玲, 等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 766-774.
- Tang Y, Liu W L, Song X L, *et al.* Effects of dietary with *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 766-774 (in Chinese).
- [11] Ringø E, Van Doan H, Lee S, *et al.* Lactic acid bacteria in shellfish: possibilities and challenges[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2020, 28(2): 139-169.
- [12] Flint H J, Scott K P, Louis P, *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(10): 577-589.
- [13] Li C, Ren Y C, Jiang S H, *et al.* Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 69-75.
- [14] Yu L L, Zhai Q X, Zhu J M, *et al.* Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 143: 307-314.
- [15] Hamdan A M, El-Sayed A F M, Mahmoud M M. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(4): 1061-1073.
- [16] 包鹏云, 李璐瑶, 陈炜, 等. 饲料中添加混合益生菌对幼参生长、消化酶活性和体壁营养组成的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(1): 52-56.
- Bao P Y, Li L Y, Chen W, *et al.* Effects of dietary supplementation of probiotics on growth, digestive enzyme activity and nutrient profile of body wall in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(1): 52-56 (in Chinese).

- [17] Adorian T J, Jamali H, Farsani H G, *et al.* Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(1): 248-255.
- [18] 钱淑媛, 王福强, 愍素连, 等. 复合益生菌粉对刺参生长·体壁成分和消化酶活性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(20): 129-132.
- Qian S Y, Wang F Q, Han S L, *et al.* Effects of compound probiotics powder on the growth performance, body wall composition and digestive enzyme activity of sea cucumber[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(20): 129-132 (in Chinese).
- [19] Yang G, Tian X L, Dong S L, *et al.* Effects of dietary *Bacillus cereus* G19, *B. cereus* BC-01, and *Paracoccus marcusii* DB11 supplementation on the growth, immune response, and expression of immune-related genes in coelomocytes and intestine of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 800-807.
- [20] 韩莎, 胡炜, 李成林, 等. 饲料中添加微生态制剂对仿刺参生长、消化和免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(6): 2800-2806.
- Han S, Hu W, Li C L, *et al.* Effects of dietary probiotics on growth, digestion and immune function of sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(6): 2800-2806 (in Chinese).
- [21] 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).
- [22] 张涛, 白岚, 李蕾, 等. 不同添加量的益生菌组合对仿刺参消化和免疫指标的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(S1): 64-68.
- Zhang T, Bai L, Li L, *et al.* Effect of different combinations of probiotics on digestibility and immunity index in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(S1): 64-68 (in Chinese).
- [23] Ji T T, Dong Y W, Dong S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature[J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1-4): 180-187.
- [24] Beauchamp C O, Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1973, 317(1): 50-64.
- [25] Martins D, English A M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast[J]. *Redox Biology*, 2014, 2: 308-313.
- [26] Wang T T, Sun Y X, Jin L J, *et al.* *Aj-rel* and *Aj-p105*, two evolutionary conserved NF- κ B homologues in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and their involvement in LPS induced immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 17-22.
- [27] Li Y, Yang Y Y, Ji Q Q, *et al.* The function of *Apostichopus japonicus* catalase in sea cucumber intestinal immunity[J]. *Aquaculture*, 2020, 521: 735103.
- [28] 梁春蕾. 不同规格的野生与养殖刺参免疫力比较研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
- Liang C L. Comparison on the immunity of wild and cultured *Apostichopus japonicus* with different weight[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [29] 张斯, 郑有虎, 张峰. 仿刺参补体 *AjC3* 基因克隆及其功能分析 [C]//2014 年中国水产学会学术年会论文集. 长沙: 中国水产学会, 2014.
- Zhang S, Zheng Y H, Zhang F. Japonicus complement *AjC3* cloning and functional analysis[C]//2014 Annual Conference of Chinese Fisheries Society. Changsha: Chinese Fisheries Society, 2014.
- [30] Dash G, Raman R P, Prasad K P, *et al.* Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 167-174.
- [31] 陈树河, 陈秋, 常云胜, 等. 复合益生菌在水产养殖中的作用机制研究进展[J]. *河南农业科学*, 2016, 45(4): 12-18.
- Chen S H, Chen Q, Chang Y S, *et al.* Research advance on application mechanisms of multispecies probiotic in aquaculture[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(4): 12-18 (in Chinese).

- [32] 金若晨, 江敏, 孙世玉, 等. 凡纳滨对虾养殖环境及肠道微生物群落特征分析[J]. 水产学报, 2020, 44(12): 2037-2054.
Jin R C, Jiang M, Sun S Y, *et al.* Microbial community in *Litopenaeus vannamei* intestine and its aquaculture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(12): 2037-2054 (in Chinese).
- [33] 朱文根, 李星浩, 饶刘瑜, 等. 感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 43(1): 109-116.
Zhu W G, Li X H, Rao L Y, *et al.* Effects of reovirus infection on the intestinal microbiota diversity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(1): 109-116 (in Chinese).
- [34] 黄雪敏, 温崇庆, 梁华芳, 等. 健康和发病凡纳滨对虾糠虾期育苗池水体的菌群结构比较[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(4): 27-34.
Huang X M, Wen C Q, Liang H F, *et al.* Comparison of bacterial community structure in larval rearing water between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei* mysis[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(4): 27-34 (in Chinese).
- [35] Xie J J, Liu Q Q, Liao S Y, *et al.* Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 90: 456-465.
- [36] Foysal M J, Alam M, Kawser A Q M R, *et al.* Metagenomics technologies reveals beneficiary effects of *Lactobacillus plantarum* as dietary supplements on gut microbiota, immune response and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734974.
- [37] 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.
- [38] Li H Q, Zhou Y, Ling H Y, *et al.* The effect of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance, immunity, intestinal microbiota and disease resistance of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0223428.
- [39] Yang G, Peng M, Tian X L, *et al.* Molecular ecological network analysis reveals the effects of probiotics and florfenicol on intestinal microbiota homeostasis: an example of sea cucumber[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4778.
- [40] 秦璐, 陈曦, 裘丽萍, 等. 小球藻对罗非鱼养殖水体水质及细菌群落结构的影响[J]. 中国农学通报, 2021, 37(12): 112-120.
Qin L, Chen X, Qiu L P, *et al.* Effect of *Chlorella* on the quality and bacterial community structure of GIFT tilapia culture water[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(12): 112-120 (in Chinese).
- [41] Binda C, Lopetuso L R, Rizzatti G, *et al.* Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2018, 50(5): 421-428.
- [42] Zothanpuia, Passari A K, Leo V V, *et al.* Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 68.

Effects of *Lactobacillus plantarum* (LP HMX-3) on growth, digestion, immunity and intestinal flora of *Apostichopus japonicus*

WANG Mengmei¹, LÜ Chengjie², YANG Dinglong^{2*}, ZHAO Jianmin²

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is one of the most important economic species of mariculture in north China, but the frequent outbreaks of various diseases such as skin ulceration syndrome hindered the sustainable development of *A. japonicus* aquaculture. As an important part of disease prevention and control, probiotics will hopefully replace antibiotics and be widely used in aquaculture industry. This experiment was conducted to investigate the effects of *Lactobacillus plantarum* LP HMX-3 on growth performance, digestive enzyme activity, immune ability and intestinal flora of *A. japonicus*. A total of 270 *A. japonicus* with an average initial body weight about (4.22 ± 0.05) g were randomly divided into 3 groups, three replicates for each group, 30 *A. japonicus* for each repetition. The basal diet was used as control group (C group). Two experimental diets were obtained by adding 10^5 CFU/g (LL group) and 10^7 CFU/g (LM group) LP HMX-3 to the basal diet. The feeding experiment lasted for 8 weeks. The experimental results show that ①The final body weight, weight gain rate and specific growth rate of juvenile sea cucumber *A. japonicus* were significantly increased by adding LP HMX-3, and the LL group had better growth index. ②Compared with control group, the intestinal amylase activity in LL group and the intestinal lipase activity in LM group were significantly enhanced, while there was no significant difference in intestinal trypsin activity among all groups, but the value of probiotics groups was higher, indicating that LP HMX-3 may improve the digestion and absorption of nutrients in *A. japonicus*. ③Compared with control group, the activities of alkaline phosphatase and catalase were significantly increased in the group of LL and LM, and the acid phosphatase activity was significantly increased in the group of LM. There was no significant difference in superoxide dismutase activity among all groups. Besides, the mRNA expression levels of *Aj*-p105 and *Aj*-catalase in LL and LM groups were significantly increased compared with that in control group, and the mRNA expression level of *Aj*-C3 in LM group was also significantly higher than that in control group. These results demonstrated that dietary with *L. plantarum* LP HMX-3 supplemented could enhance the immune capacity of *A. japonicus*. ④All alpha indices suggested that LP HMX-3 significantly increased intestinal microbial richness and evenness, but the level of addition had little effect. The Beta diversity analysis indicated that the bacteria communities in probiotic supplemented groups were quite similar, while different from control group. ⑤At the level of phylum, the relative abundance of Proteobacteria in control group was significantly higher than any other groups, while that of Firmicutes in LL group increased significantly compared with control group. The relative abundance of Bacteroidota, Cyanobacteria and Campilobacterota was significantly increased in the group of LL and LM, compared with those in control group. At the genus level, the relative abundance of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Clostridium* in LL and LM groups was higher than that in C group, indicating that LP HMX-3 significantly increased the abundance of potential probiotics. The results of the study suggested that adding *L. plantarum* LP HMX-3 to the diet could effectively promote the growth of *A. japonicus*, improve its digestion and immunity capacity to a certain extent, and actively regulate the intestinal microflora of *A. japonicus*. In summary, the results of this study confirmed the probiotic effect of *L. plantarum* LP HMX-3 in *A. japonicus*, and provided technical support and scientific evidence for its application in aquaculture.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *Lactobacillus plantarum*; growth performance; digestive enzyme; immune ability; intestinal flora

Corresponding author: YANG Dinglong. E-mail: dlyang@yic.ac.cn

Funding projects: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA23050303); National Natural Science Foundation of China (41806196); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BD022); Yantai Science and Technology Development Project (2020MSGY066)