

文章编号: 1000-0615(2019)04-1126-12

DOI: 10.11964/jfc.20180211186

## 低鱼粉饲料添加枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、 消化酶活性、抗氧化酶活性及其mRNA表达的影响

李军亮, 杨奇慧\*, 谭北平, 董晓慧, 迟淑艳, 刘泓宇, 章双  
(广东海洋大学水产学院, 水产动物营养与饲料实验室, 广东湛江 524088)

**摘要:** 为探究低鱼粉饲料添加枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、消化酶活性、抗氧化酶活性及其mRNA表达水平的影响, 实验以720尾初始均重为(7.00±0.02) g的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼为研究对象, 分为8个处理, 每个处理3个重复, 设计1个正常鱼粉对照组(鱼粉含量35%), 1个低鱼粉对照组(鱼粉含量15%)。投喂不同添加比例0(正常鱼粉对照组)、0(低鱼粉对照组)、0.10%、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%和1.25%枯草芽孢杆菌的饲料, 养殖期8周。结果显示, 低鱼粉条件下, 添加不同比例枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的成活率无显著影响。增重率与特定生长率随添加量的变化呈先上升后下降趋势, 但均显著高于低鱼粉对照组, 低于正常鱼粉对照组; 当添加0.75%枯草芽孢杆菌时, 饲料系数最低, 其他各组显著低于低鱼粉组, 高于正常鱼粉组, 而蛋白质效率的变化规律则与饲料系数相反。随枯草芽孢杆菌添加量的增加, 肠蛋白酶、淀粉酶活性先升高后降低。血清过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性, 在添加0.75%枯草芽孢杆菌的饲料组达到最大值。肝脏过氧化氢酶mRNA相对表达水平在添加量为0.50%达到最大值, 谷胱甘肽还原酶mRNA表达水平在枯草芽孢杆菌添加量为0.75%时达到最大值。通过哈维氏弧菌攻毒实验7 d, 珍珠龙胆石斑鱼存活率随枯草芽孢杆菌添加量的增加显著升高。以增重率为判断依据, 根据折线模型得出, 低鱼粉条件下(豆粕替代配方中20%鱼粉), 饲料中添加0.63%枯草芽孢杆菌( $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)可显著促进珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的生长, 提高抗病力、消化酶、血清过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性及其mRNA表达水平。

**关键词:** 珍珠龙胆石斑鱼; 枯草芽孢杆菌; 生长; 酶活性; mRNA表达

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) 隶属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 是由鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus* ♂)与棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus* ♀)杂交而来, 融合了亲本生长迅速、抗病力强、肉质细腻的优点, 近年来在广东、海南等地大量养殖<sup>[1-4]</sup>。但是, 随着养殖规模的迅速扩增, 一系列传染性疾病也随之而来, 严重

阻碍其产业健康发展<sup>[5-7]</sup>。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为革兰氏阳性菌, 是一类好氧型细菌, 具有耐高温、耐胆盐、耐酸性等特性, 在极端环境下会产生内源性孢子, 可在饲料制粒之后保持极高的存活率<sup>[8]</sup>。在机体内消耗氧气, 释放丙酸、乙酸和丁酸等, 创造厌氧微酸环境, 促进有益厌氧菌生长、抑制有害菌生长, 调节肠道微生态平衡, 增强抗毒抗

收稿日期: 2018-02-16 修回日期: 2018-05-17

资助项目: 国家自然科学基金(31772864, 31802316); 现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 广东省科技厅社会发展领域科技计划(2013B021100017); 广东省自然科学基金(2015A030313621, 2016A030313749); 广东省创新强校工程项目(2015050206)

通信作者: 杨奇慧, E-mail: qihuiyang03@163.com

病能力,还可以产生多种消化酶如淀粉酶(amy-lase, AMY)、蛋白酶(trypsin, TRY)等促进饲料降解,提高饲料利用率<sup>[9-10]</sup>。近几年,枯草芽孢杆菌在水产动物应用上的研究已成为热点。沈斌乾等<sup>[11]</sup>已经证实了投喂含有枯草芽孢杆菌的饲料可以显著提高青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)的增重率、消化酶活性。邱燕等<sup>[12]</sup>用含有枯草芽孢杆菌的饲料投喂草鱼(*Ctenopharyngodon idella*),结果显示,其提高了草鱼的生长性能和饲料转化率。

鱼粉因其蛋白质含量高、含有多种必需氨基酸、容易被吸收等多种优点,目前是水产饲料中主要的蛋白源。然而,随着水产养殖业的快速发展与鱼粉资源的缩减造成价格飙升,因此寻求鱼粉的替代品成为近几年的研究热点。而豆粕价格适中,产量稳定,成为当下鱼粉替代品的常用选择<sup>[13-15]</sup>。

目前,石斑鱼商业配方中鱼粉用量大多高于30%<sup>[2-3, 16]</sup>,这使得鱼粉占配方成本中的比例较高。同时,关于枯草芽孢杆菌对石斑鱼影响的研究大多仅限于对其生长和饲料利用的影响,而对于枯草芽孢杆菌在鱼体中的抗氧化作用及抗氧化相关酶基因表达影响的研究则较少。因此,本实验旨在低鱼粉的基础上研究饲料中添加不同比例枯草芽孢杆菌,探讨其对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、消化酶活性、抗病力、抗氧化相关酶活性及其mRNA表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料配制

实验饲料以鱼粉、豆粕、玉米蛋白粉为主要蛋白源,以鱼油、玉米油、大豆卵磷脂为主要脂肪源,实验饲料组成与营养水平见表1,分别添加0(正常鱼粉对照组)、0(低鱼粉对照组)、0.10%、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%和1.25%的枯草芽孢杆菌。饲料原料经粉碎后过60目筛,准确称取各组份所需的添加量,其中,大宗原料先置于V型混合机(VH-6,江苏驰通)混合10 min,微量元素等通过逐级扩大法混合均匀,然后以双螺杆挤条机(F-26华南理工大学,广州)配制成直径为2 mm的饲料,风干后分装于-20 °C冰箱保存备用。

### 1.2 饲养管理及材料来源

养殖实验在广东海洋大学湛江东海岛海洋

生物研究基地0.5 m的玻璃纤维钢桶中进行,实验鱼苗来源于广东雷州如朝育苗场。鱼苗于室外水泥池暂养7 d,挑选初始体质量为(7.00±0.02) g的健康个体,以每桶30尾分成8个处理组,饲喂对应的实验饲料,每组设3个重复。饱食投喂,每天投喂2次(8:00和17:00),根据天气、摄食和生长情况相应调整投喂量。实验期间每天换水,换水量2/3,不断充气使溶解氧达到饱和(7~8 mg/L),水温为(30.5±0.8) °C,盐度为29~31, pH 7.2~7.8,氨氮低于0.02 mg/L,养殖周期8周。

实验用枯草芽孢杆菌菌种来源于广东省微生物菌种保藏中心(GIM:1.222),通过复苏扩配成 $1.0 \times 10^8$  cfu/mL的菌液,在加水搅拌环节溶于水中添加于饲料。攻毒用哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)菌种由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室提供。

### 1.3 样品采集与测定

实验结束前停喂24 h,用一次性无菌注射器(1 mL)于尾静脉采血,3 500 r/min离心10 min(3K30, Sigma, 德国),取上清液于1.5 mL的离心管中,保存在-80 °C超低温冰箱(Thermo Electron corporation, 美国)中备用。用无菌镊子及剪刀取6尾鱼的肝脏和肠道放于离心管中,液氮速冻后于-80 °C保存,用于消化酶活性的测定。再取6尾鱼的肝脏和肠道放于装有RNA later的离心管中,放于-80 °C超低温冰箱保存备用。每个处理随机选取30尾鱼,分为3个重复,每个重复10尾,以哈维氏弧菌( $1 \times 10^7$  cfu/mL)腹腔注射进行攻毒试验,生理盐水作对照组,观察记录7 d,计算累计存活率,具体方法参照文献<sup>[17]</sup>。

计算公式:

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

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

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

$$\text{饲料系数(feed conversion ratio, FCR)} = W_f / (W_t - W_0);$$

$$\text{蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER, \%)} = (W_t - W_0) / (W_f \times W_p) \times 100\%$$

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

表 1 实验饲料组成与营养水平(干物质)  
Tab. 1 Composition and nutrients levels of the experiment diets (DM) %

项目 items	枯草芽孢杆菌/% <i>B. subtilis</i>							
	正常鱼粉(0) normal fish meal	0	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25
<b>原料 ingredient</b>								
红鱼粉 brown fish meal	35	15	15	15	15	15	15	15
豆粕 soybean meal	20	40	40	40	40	40	40	40
玉米蛋白粉 corn gluten meal	20	20	20	20	20	20	20	20
面粉 wheat flour	13.32	13.32	13.32	13.32	13.32	13.32	13.32	13.32
鱼油 fish oil	2	2	2	2	2	2	2	2
玉米油 corn oil	2	2	2	2	2	2	2	2
大豆卵磷脂 soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2
维生素预混料 <sup>a</sup> vitamin premix	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
矿物质预混料 <sup>b</sup> mineral premix	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
氯化胆碱 choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸二氢钙 Ca (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1
维生素C vitamin C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
诱食剂 attractant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulose sodium	3	3	3	3	3	3	3	3
合计 total	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>营养水平 nutrient levels</b>								
粗蛋白 crude protein	47.45	43.65	43.65	43.65	43.65	43.65	43.65	43.65
粗脂肪 crude lipid	9.78	8.39	8.39	8.39	8.39	8.39	8.39	8.39

注: a. 维生素预混料为每kg饲料提供, 维生素B<sub>1</sub> 25.5 mg, 核黄素 25 mg, 吡哆醇50 mg, 氰钴胺素 0.1 mg, 叶酸6.25 mg, 泛酸钙61 mg, 肌醇 800 mg, 烟酸 201 mg, 生物素 2.5 mg, 维生素A 10 mg, 维生素D 120 mg, 维生素E 99 mg, 维生素K 10 mg, 纤维素 589.65 mg; b. 矿物质预混料为每kg饲料提供, KIO<sub>4</sub> 0.06 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8.14 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 39.68 mg, 柠檬酸铁27.42 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 56.56 mg, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.24 mg, Ca (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 160 mg, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 24.86 mg, KCl 30.66 mg, NaSeO<sub>3</sub> 4 mg, 沸石粉1 648.38 mg

Notes: a. the vitamin premix provided the following for per kg of diet, thiamin 25.5 mg, riboflavin 25 mg, pyridoxine 50 mg, cyanocobalamine 0.1 mg, folic acid 6.25 mg, calcium pantothenate 61 mg, inositol 800 mg, niacin 201 mg, biotin 2.5 mg, vitamin A 10 mg, vitamin D 120 mg, vitamin E 99 mg, vitamin K 10 mg, cellulose 589.65 mg; b. the mineral premix provided the following for per kg of diet, KIO<sub>4</sub> 0.06 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8.14 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 39.68 mg, ferric citrate 27.42 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 56.56 mg, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.24 mg, Ca (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 160 mg, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 24.86 mg, KCl 30.66 mg, NaSeO<sub>3</sub> 4 mg, zeolite powder 1 648.38 mg

(d),  $W_f$ 为摄入饲料量(g),  $W_p$ 为饲料中的粗蛋白含量(%).

饲料和全鱼的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分的测定参考AOAC<sup>[18]</sup>。水分的检测采用105 °C干燥恒重法, 粗蛋白的检测采用凯氏定氮法, 粗脂肪的检测采用索氏抽提法, 粗灰分的检测采用箱式马弗炉550 °C灼烧法。血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase CAT), 肠道中AMY, TRY活性采用南京

建成生物工程研究所试剂盒测定, 具体操作严格按照各试剂盒说明书执行。

#### 1.4 CAT、谷胱甘肽还原酶mRNA表达量的测定

引物设计 CAT、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)引物设计参照文献<sup>[19-20]</sup>, 引物均由上海英潍捷基贸易有限公司合成, 内参基因 $\beta$ -actin和目的基因CAT、GR的引物序列见表2。

表2 RT-PCR所用引物序列

目的基因 target genes	引物序列(5'-3') primer sequences
<i>β-actin</i>	F: TACGAGCTGCCTGACGGACA
	R: GGCTGTGATCTCCTTCTGC
<i>CAT</i>	F: GCGTTTGGTTACTTTGAGGTGA
	R: GAGAAGCGGACAGCAATAGGT
<i>GR</i>	F: CTTTCACTCCGATGTATCACGC
	R: GCTTTGGTAGCACCCATTTTG

总RNA提取及cDNA的合成 采用TRIzol (TaKaRa, 大连)法提取鱼肝脏中的总RNA, 具体操作方法参照说明书和刘鹏飞等<sup>[21]</sup>方法。

采用TaKaRa公司的PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒提取到的总RNA进行反转录, 合成cDNA, 具体操作按照试剂盒说明书及参照黄旭雄等<sup>[22]</sup>方法。

RT-PCR分析 按照SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 大连)试剂盒说明操作, 在ABI 7500 Real Time PCR System进行RT-PCR。反应体系见表3, mRNA表达结果采用相对表达量中的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法<sup>[23]</sup>分析计算。

表3 荧光定量反应体系

试剂 reagent	使用量/ $\mu$ L usage
SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ )	10.0
PCR Forward Primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4
ROX Reference Dye II (50 $\times$ )	0.4
RT反应液	2.0
dH <sub>2</sub> O	6.8
合计 total	20.0

## 1.5 数据处理

实验数据用SPSS Version 16.0软件进行统计分析, 先对数据作单因素方差分析(One-Way ANOVA), 如有显著性差异( $P < 0.05$ ), 则进行Duncan氏多重比较, 实验数据用“平均值 $\pm$ 标准

差”(mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能的影响

枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的SR无显著影响( $P > 0.05$ )(表4); WGR与SGR呈先上升后下降趋势, 但均显著高于低鱼粉对照组, 低于正常鱼粉对照组( $P < 0.05$ ), 在0.75%组达到最大值; 当添加0.75%枯草芽孢杆菌时, FCR最低, 其他各组显著低于低鱼粉对照组( $P < 0.05$ ), PER的变化规律则与FCR相反(表4)。以WGR为判断依据, 根据折线模型得出其促进珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长最适添加量为0.63%(图1)。

### 2.2 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼体成分的影响

枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼体成分含量均无显著影响( $P > 0.05$ )(表5)。

### 2.3 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼消化酶和抗氧化酶活性的影响

低鱼粉条件下添加枯草芽孢杆菌, 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肠中TRY、AMY活性先升高后降低, 在添加0.75%枯草芽孢杆菌时达到最大值, 其余各组均低于正常鱼粉对照组、高于低鱼粉对照组( $P < 0.05$ )。血清CAT和SOD活性, 在添加量为0.75%时达到最大值, 其余各组均低于正常鱼粉对照组、高于低鱼粉对照组( $P < 0.05$ )(表6)。

### 2.4 枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼抗病力的影响

哈维氏弧菌攻毒1周的珍珠龙胆石斑鱼存活率随枯草芽孢杆菌添加比例的升高而增大, 实验组存活率显著高于对照组( $P < 0.05$ )(图2)。

### 2.5 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼CAT、GR mRNA表达的影响

随着枯草芽孢杆菌添加比例的增加, 肝脏CAT、GR mRNA相对表达水平呈先升高后降低趋势。CAT mRNA表达量在添加比例为0.50%时达到最大值, 其余各组均高于低鱼粉对照组、低于正常鱼粉对照组(图3)。GR mRNA表达水平在添加比例为0.75%达到最大值, 其余各组均高于低鱼粉对照组低于正常鱼粉对照组(图4)。

表 4 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能的影响

Tab. 4 Effects of *B. subtilis* supplemented in low-fishmeal diets on growth performance of juvenile *E. lanceolatu*♂×*E. fuscoguttatus*♀

添加比例/% supplemental level	成活率/% SR	增重率/% WGR	特定增长率/(%/d) SGR	蛋白质效率/% PER	饲料系数 FCR
正常鱼粉(0) normal fishmeal	97.22±2.54	448.00±41.61 <sup>d</sup>	3.15±0.13 <sup>d</sup>	2.16±0.03 <sup>f</sup>	1.04±0.02 <sup>a</sup>
0	98.89±1.92	295.33±6.50 <sup>a</sup>	2.55±0.03 <sup>a</sup>	1.74±0.01 <sup>a</sup>	1.32±0.02 <sup>f</sup>
0.10	98.89±1.92	315.33±4.72 <sup>ab</sup>	2.65±0.01 <sup>b</sup>	1.82±0.02 <sup>b</sup>	1.24±0.02 <sup>c</sup>
0.25	100±0	327.67±6.65 <sup>bc</sup>	2.67±0.04 <sup>b</sup>	2.03±0.07 <sup>d</sup>	1.12±0.03 <sup>c</sup>
0.50	100±0	341.33±4.15 <sup>bc</sup>	2.75±0.02 <sup>bc</sup>	2.13±0.01 <sup>ef</sup>	1.07±0.01 <sup>ab</sup>
0.75	98.89±1.92	352.33±9.29 <sup>c</sup>	2.79±0.04 <sup>c</sup>	2.16±0.03 <sup>f</sup>	1.04±0.01 <sup>a</sup>
1.00	100±0	334.33±1.50 <sup>bc</sup>	2.72±0.01 <sup>bc</sup>	2.08±0.07 <sup>bc</sup>	1.09±0.05 <sup>bc</sup>
1.25	100±0	330.33±4.51 <sup>bc</sup>	2.70±0.02 <sup>bc</sup>	1.94±0.02 <sup>c</sup>	1.17±0.02 <sup>d</sup>

注：同列肩标上有不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )，下同

Notes: in the same column, values with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ), the same below

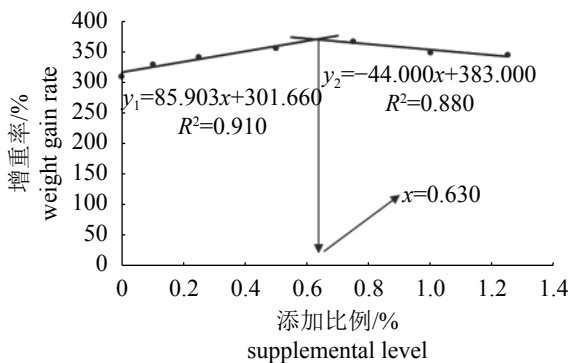


图 1 枯草芽孢杆菌添加比例与珍珠龙胆石斑鱼幼鱼增重率关系模式图

Fig. 1 Effects of supplemental level of *B. subtilis* on WGR of juvenile *E. lanceolatu*♂×*E. fuscoguttatus*♀

### 3 讨论

#### 3.1 低鱼粉条件下，枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能的影响

降低鱼粉用量，是近年水产动物营养与饲料研究的热点<sup>[24]</sup>。枯草芽孢杆菌是饲料添加剂中常用的益生菌，对水产动物等具有促进生长的作用<sup>[25]</sup>。本实验结果显示，低鱼粉饲料中添加枯草芽孢杆菌可显著提高珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的WGR、SGR，但低于正常鱼粉对照组，可能是由于鱼粉比例降低和营养成分降低导致的。在枯草芽孢杆菌的添加比例为0.75%时，珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的WGR、SGR均显著高于低鱼粉对

照组、低于正常鱼粉对照组，FCR显著低于低鱼粉对照组、高于正常鱼粉对照组( $P<0.05$ )。以WGR为判断依据，通过折线模型，可知珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中枯草芽孢杆菌的适宜添加量为0.63%。研究表明，在低鱼粉条件下，添加适量的枯草芽孢杆菌能更好地促进珍珠龙胆石斑鱼幼鱼健康生长。这与点带石斑鱼(*E. coioides*)<sup>[26-27]</sup>、草鱼<sup>[28]</sup>等的研究结果类似。枯草芽孢杆菌促进珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长，可能与其创造酸性环境，抑制有害菌生长，调节肠道微生态平衡，产生多种消化酶<sup>[10-11]</sup>等作用有关。然而，添加比例过高反而会抑制其生长，可能由于过量的枯草芽孢杆菌会抑制其他有益菌生长，造成肠道有益菌群生态失衡，从而抑制石斑鱼生长，但具体作用机理还有待深入研究。低鱼粉饲料中添加枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的促生长作用效果没有正常鱼粉对照组的好，可能与鱼粉含量差异较大导致营养水平降低有关。但0.75%添加组的FCR却与正常鱼粉组无显著差异，可能是由于添加适量的芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的促消化作用效果比较好。

#### 3.2 低鱼粉条件下，枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼消化酶活性的影响

有研究表明，在饲料中添加适量的芽孢杆菌可以提高水产动物的消化酶活性，从而提高水产动物的增重率、饵料利用率<sup>[29]</sup>。本研究结果显示，低鱼粉条件下，枯草芽孢杆菌可显著提高珍珠龙胆石斑鱼的肠道消化酶活性，但低于

表5 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼体成分的影响

Tab. 5 Effects of *B. subtilis* supplemented in low-fishmeal diets on body composition of juvenile *E. lanceolatu*♂×*E. fuscoguttatus*♀

添加比例/% supplemental level	水分 moisture	粗蛋白 crude protein	粗脂肪 crude lipid	粗灰分 crude ash
正常鱼粉(0) normal fishmeal	67.65±0.04	56.01±0.06	22.35±0.04	14.55±0
0	67.71±0.02	56.70±0.10	22.37±0.03	14.51±0.01
0.10	67.63±0.01	56.15±0.07	22.37±0.01	14.52±0.03
0.25	67.65±0.03	56.11±0.02	22.35±0.04	14.56±0
0.50	67.66±0.01	55.97±0.13	22.35±0.01	14.51±0.02
0.75	67.65±0.01	56.15±0.55	22.33±0.02	14.56±0.01
1.00	67.68±0.01	56.05±0.05	22.32±0.01	14.54±0.02
1.25	67.63±0.01	56.08±0.06	22.35±0.01	14.56±0.01

表6 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼消化酶、抗氧化酶活性的影响

Tab. 6 Effects of *B. subtilis* supplemented in low-fishmeal diets on digestive and antioxidant enzyme activities of juvenile *E. lanceolatu*♂×*E. fuscoguttatus*♀

添加比例/% supplemental level	蛋白酶/(U/mg prot) TRY	淀粉酶/(U/mg prot) AMY	过氧化氢酶/(U/mL) CAT	超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD
正常鱼粉(0) normal fishmeal	183.56±2.19 <sup>f</sup>	0.46±0.01 <sup>de</sup>	24.56±0.66 <sup>d</sup>	26.42±0.94 <sup>e</sup>
0	152.07±1.74 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>	15.78±0.95 <sup>a</sup>	15.78±0.50 <sup>a</sup>
0.10	166.78±0.54 <sup>b</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	16.97±0.78 <sup>ab</sup>	16.97±0.23 <sup>b</sup>
0.25	170.23±0.66 <sup>c</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	17.53±0.17 <sup>b</sup>	18.20±0.45 <sup>c</sup>
0.50	174.49±1.06 <sup>de</sup>	0.45±0.01 <sup>cd</sup>	20.59±1.08 <sup>c</sup>	21.59±1.03 <sup>d</sup>
0.75	181.44±1.00 <sup>f</sup>	0.47±0.01 <sup>c</sup>	23.27±0.88 <sup>d</sup>	24.94±0.54 <sup>f</sup>
1.00	173.38±1.06 <sup>d</sup>	0.44±0.01 <sup>c</sup>	20.79±0.79 <sup>c</sup>	22.79±0.38 <sup>e</sup>
1.25	176.58±1.20 <sup>e</sup>	0.41±0.01 <sup>b</sup>	21.20±0.47 <sup>c</sup>	20.87±0.43 <sup>d</sup>

正常鱼粉对照组, 0.75%添加组的蛋白酶活性却与正常鱼粉对照组无显著差异, 可能是由于添加适量的芽孢杆菌提高蛋白酶活性的作用效果比较明显。这在杂交鲟(*Huso huso*♀×*Acipenser schrenckii*♂)<sup>[30]</sup>、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)<sup>[31]</sup>等的研究结果相一致。目前已有研究表明, 添加芽孢杆菌可提高水产动物肠道消化酶活性, 从而促进动物生长。其作用的机制可能有以下方面: ①芽孢杆菌提供外源消化酶, 可以促进鱼类对营养物质的吸收<sup>[10]</sup>; ②长期食用添加芽孢杆菌的饲料可以刺激鱼类肠道, 促进肠道消化酶的分泌<sup>[32]</sup>。

### 3.3 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼抗病力的影响

生长实验结束后, 注射哈维氏弧菌, 分析7d

的存活率表明, 随着枯草芽孢杆菌添加比例的升高, 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼存活率也升高, 说明添加枯草芽孢杆菌能够很好地提高珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的抗病力。这与孙盛明等<sup>[33]</sup>用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染投喂过含有枯草芽孢杆菌饲料的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼, 其累计死亡率降低的结果类似。芽孢杆菌可提高石斑鱼幼鱼的抗病力原因, 主要为芽孢杆菌细胞壁主要成分肽聚糖可刺激提高水产动物免疫因子活性, 进而提高其抗病力<sup>[34-35]</sup>。

### 3.4 低鱼粉条件下枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼抗氧化酶活性及其mRNA表达的影响

SOD、CAT是水产动物体内重要的抗氧化酶, 能够有效清除自由基、产生活性氧, 防止生物分子方面的损伤, 从而达到抗病作用<sup>[36-39]</sup>。

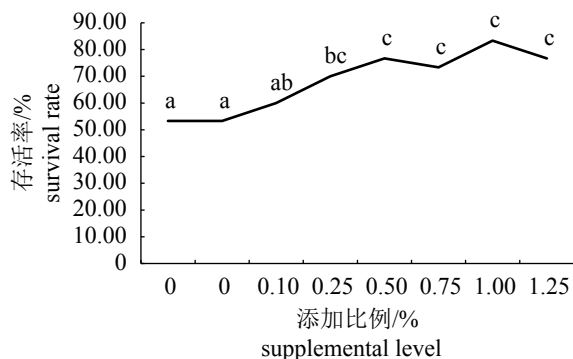


图2 哈维氏弧菌攻毒1周的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼存活率

标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Fig. 2 Survival rate after 1 week challenged with

*V. harveyi* of juvenile *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀

Different letters denote significant difference between groups ( $P<0.05$ ), the same below

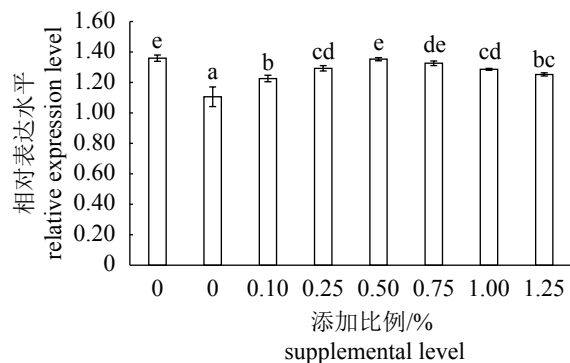


图3 枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏CAT mRNA相对表达水平的影响

Fig. 3 Effects of juvenile *E. lanceolatus* ♂ ×

*E. fuscoguttatus* ♀ fed different *B. subtilis* levels on CAT relative gene expression of liver

本实验中, 随枯草芽孢杆菌添加比例的变化, 血清CAT和SOD活性实验组均高于低鱼粉对照组, 说明添加适量枯草芽孢杆菌可提高CAT和SOD活性。这与沈文英等<sup>[40]</sup>用含有枯草芽孢杆菌的饲料饲喂草鱼、刘晓勇等<sup>[41]</sup>用含不同比例枯草芽孢杆菌的饵料饲喂杂交鲟幼鱼的结果相似; 程远等<sup>[36]</sup>也证实添加枯草芽孢杆菌可以提高吉富罗非鱼(*GIFT Oreochromis niloticus*)幼鱼的抗氧化酶活性。

CAT和GR是鱼体内重要的抗氧化酶, 主要功能是清除生物体内自由基, 提高细胞抗损伤能力<sup>[42]</sup>。研究这2种酶mRNA相对表达量可以更深入探讨珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的免疫机理。本

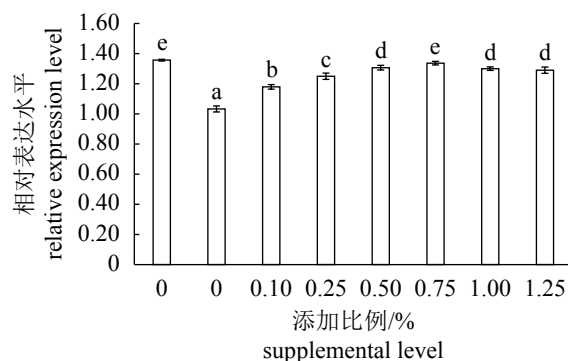


图4 枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏GR mRNA相对表达水平的影响

Fig. 4 Effects of juvenile *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀ fed different *B. subtilis* levels on GR relative gene expression of liver

实验中, CAT和GR mRNA表达量均较对照组高, 说明添加枯草芽孢杆菌能够提高珍珠龙胆石斑鱼抗氧化酶mRNA相对表达量, 与Tan等<sup>[19]</sup>、Sun等<sup>[20]</sup>的研究结果类似。虽然这2种酶的mRNA表达量不尽相同, 可能与其使用的添加剂种类不同有关。有研究表明, 芽孢杆菌可以通过增强水产动物的抗氧化能力来提高其生长速率。通过本实验结果可推测, 枯草芽孢杆菌通过自身分泌一些抗氧化酶或作为一种激活剂促进机体抗氧化基因表达以及抗氧化酶的分泌<sup>[40, 43-44]</sup>, 最终实现对机体的促生长效应。相关的机制仍有待进一步研究。

综上所述, 低鱼粉条件下(豆粕替代饲料配方中20%鱼粉), 添加枯草芽孢杆菌可促进珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长, 提高消化酶、抗氧化酶活性、抗病力和CAT、GR mRNA相对表达水平。以WGR为判断依据, 根据折线模型得出枯草芽孢杆菌最适添加量为0.63%( $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)。

#### 参考文献:

- [1] 林建斌, 梁萍, 朱庆国, 等. 海带多糖对珍珠龙胆石斑鱼生长性能和免疫力的影响[J]. 福建农业学报, 2017, 32(1): 17-21.  
Lin J B, Liang P, Zhu Q G, et al. Effect of laminarin on growth and immunity of pearl gentian grouper[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(1): 17-21(in Chinese).
- [2] 王明辉. 共轭亚油酸对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、体

- 组成及肝脏代谢相关酶活的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Wang M H. Effects of dietary conjugated linoleic acid on growth, body composition, metabolism related hepatic enzyme activities in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016(in Chinese).
- [ 3 ] 刘云, 王际英, 李宝山, 等. 蛋氨酸钴对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、矿物元素沉积及肝脏酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 574-583.
- Liu Y, Wang J Y, Li B S, *et al.* Effects of dietary cobalt methionine on growth performance, mineral deposition, and hepatic enzyme activities in juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 574-583(in Chinese).
- [ 4 ] 孙颖. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交F<sub>1</sub>代生长优势的转录组学研究[D]. 广州: 中山大学, 2016.
- Sun Y. Transcriptomic studies on the growth superiorities in a grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus*♀)×(*Epinephelus lanceolatus*♂)[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2016(in Chinese).
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Molecular studies, disease status and prophylactic measures in grouper aquaculture: economic importance, diseases and immunology[J]. Aquaculture, 2010, 309(1-4): 1-14.
- [ 7 ] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Fish health aspects in grouper aquaculture[J]. Aquaculture, 2011, 320(1-2): 1-21.
- [ 8 ] 李卓佳, 杨莺莺, 陈康德, 等. 几株有益芽孢杆菌对温度、制粒工艺及pH值的耐受性[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 16-20.
- Li Z J, Yang Y Y, Chen K D, *et al.* Endurance of temperature, processing procedure and pH by several strains of useful *Bacillus*[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 23(6): 16-20(in Chinese).
- [ 9 ] 夏汉钦. 活性和热灭活益生菌对斜带石斑鱼生长性能、肠道菌群和免疫基因表达的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2013.
- Xia H Q. Effect of viable and heat-inactivated probiotics on the growth performance, intestinal microbiota and immune-related genes expression in juvenile orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2013(in Chinese).
- [10] 惠明, 窦丽娜, 田青, 等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(27): 11623-11624.
- Hui M, Dou L N, Tian Q, *et al.* Advances in application research of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(27): 11623-11624(in Chinese).
- [11] 沈斌乾, 陈建明, 郭建林, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对青鱼生长、消化酶活性和鱼体组成的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(1): 48-53.
- Shen B Q, Chen J M, Guo J L, *et al.* Effect of adding bacillus subtilis to diets on growth performance, digestive enzymes activity and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(1): 48-53(in Chinese).
- [12] 邱燕, 蔡春芳, 代小芳, 等. 枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能与肠道黏膜形态的影响[J]. 中国饲料, 2010(19): 34-36.
- Qiu Y, Cai C F, Dai X F, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance and microvill of grass carp[J]. China Feed, 2010(19): 34-36(in Chinese).
- [13] 高荣兵, 庄平, 章龙珍, 等. 豆粕替代鱼粉对点篮子鱼生长性能的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1534-1540.
- Gao R B, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* Effects of replacement of fish meal by soybean meal on growth characters of Siganidae (*Siganus guttatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1534-1540(in Chinese).
- [14] 吴莉芳, 秦贵信, 孙泽威, 等. 饲料中去皮豆粕替代鱼粉对埃及胡子鲇消化酶活力和肠道组织的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 49(4): 99-105.
- Wu L F, Qin G X, Sun Z W, *et al.* Effect of dietary dehulled soyabean meal replacing fish meal on the activity of digestive enzyme and the intestinal tissue of *Clarias lazera*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2010, 49(4): 99-105(in Chinese).
- [15] 李学丽, 王际英, 宋志东, 等. 两种豆粕部分替代鱼粉在珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 716-725.
- Li X L, Wang J Y, Song Z D, *et al.* Research on partial replacement of fishmeal by two kinds of soybean meal in



- the feed of juvenile ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 716-725(in Chinese).
- [16] 邢克智, 郭永军, 陈成勋, 等. 维生素C对点带石斑鱼生长及其组织抗氧化性能的影响[J]. 水产科学, 2012, 31(11): 635-639.
- Xing K Z, Guo Y J, Chen C X, *et al.* Effects of dietary vitamin C levels on growth and tissue antioxidant function in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. Fisheries Science, 2012, 31(11): 635-639(in Chinese).
- [17] 李小梅, 杨丽冬, 张家学, 等. 一种复合益生菌对斜带石斑鱼生长及免疫特性影响的研究[J]. 饲料工业, 2015, 36(2): 30-33.
- Li X M, Yang L D, Zhang J X, *et al.* Effects of a compound probiotics on growth and immunity characteristics of *Epinephelus coioides*[J]. Feed Industry, 2015, 36(2): 30-33(in Chinese).
- [18] AOAC. Official methods of analysis[M]. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [19] Tan X H, Sun Z Z, Liu Q Y, *et al.* Effects of dietary ginkgo biloba leaf extract on growth performance, plasma biochemical parameters, fish composition, immune responses, liver histology, and immune and apoptosis-related genes expression of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) fed high lipid diets[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 399-409.
- [20] Sun Z Z, Tan X H, Ye H Q, *et al.* Effects of dietary *Panax notoginseng* extract on growth performance, fish composition, immune responses, intestinal histology and immune related genes expression of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) fed high lipid diets[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 234-244.
- [21] 刘鹏飞, 刘庆慧, 吴垠, 等. 白斑综合征病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD*基因的表达[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(4): 89-93.
- Liu P F, Liu Q H, Wu Y, *et al.* Expression of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* gene of *Litopenaeus vannamei* response to WSSV infection[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(4): 89-93(in Chinese).
- [22] 黄旭雄, 罗词兴, 危立坤, 等. 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌机能的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 2049-2058.
- Huang X X, Luo C X, Wei L K, *et al.* Effects of dietary yeast extract supplementation on the immune-related gene expressions and vibrio-resistant ability in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 2049-2058(in Chinese).
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method[J]. Methods, 2002, 25(4): 402-408.
- [24] 周兴华, 向泉, 陈建. 鱼粉替代物在水产饲料中的应用[J]. 中国饲料, 2002(4): 23-25.
- Zhou X H, Xiang X, Chen J. Application of fish meal alternatives in aquatic feed[J]. China Feed, 2002(4): 23-25(in Chinese).
- [25] 高欣, 盖力强, 李美英, 等. 芽孢杆菌对西伯利亚鲟幼鱼摄食生长和消化率的影响[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2009, 33(3): 377-382.
- Gao X, Gai L Q, Li M Y, *et al.* Effects of *Bacillus* spp. On the growth performance and digestibility of juvenile *Acipenser baeri*[J]. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2009, 33(3): 377-382(in Chinese).
- [26] Purwandari A R, Chen H Y. Effects of probiotic *Bacillus subtilis* on intestinal microbial diversity and immunity of orange spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Applied Biotechnology, 2013, 1(1): 25-36.
- [27] Liu C H, Chiu C H, Wang S W, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 699-706.
- [28] Wu Z X, Feng X, Xie L L, *et al.* Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2012, 28(5): 721-727.
- [29] 管越强, 周环, 张磊, 等. 枯草芽孢杆菌对中华鳖生长性能、消化酶活性和血液生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 235-240.
- Guan Y Q, Zhou H, Zhang L, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance, digestive enzyme activities and blood biochemical indices of *Pelodiscus sinensis*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010,

- 22(1): 235-240(in Chinese).
- [30] 徐奇友,王金革,王连生,等.巨大芽孢杆菌对杂交鲟消化酶活性和肠道形态影响[J].东北农业大学学报,2017,48(5):50-57.  
Xu Q Y, Wang J G, Wang L S, *et al.* Effect of *Bacillus megaterium* to plant protein meal on digestive enzyme activity and intestinal morphology of juvenile hybrid sturgeon[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2017, 48(5): 50-57(in Chinese).
- [31] 刘波,刘文斌,王恬.地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(4):80-84.  
Liu B, Liu W B, Wang T. Effects of *Bacillus licheniformis* on digestive performance and growth of *Allogynogenetic crucian*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(4): 80-84(in Chinese).
- [32] 刘小刚,周洪琪,华雪铭,等.微生态制剂对异育银鲫消化酶活性的影响[J].水产学报,2002,26(5):448-452.  
Liu X G, Zhou H Q, Hua X M, *et al.* Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast on activities of digestive enzymes of allogynogenetic crucian carp[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(5): 448-452(in Chinese).
- [33] 孙盛明,苏艳丽,张武肖,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对团头鲂幼鱼生长性能、肝脏抗氧化指标、肠道菌群结构和抗病力的影响[J].动物营养学报,2016,28(2):507-514.  
Sun S M, Su Y L, Zhang W X, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, liver antioxidant ability, intestinal microflora structure and disease resistance of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(2): 507-514(in Chinese).
- [34] 胡曦,杨红玲,孙云章.饲料中添加芽孢杆菌细胞壁对斜带石斑鱼生长、消化酶活性及免疫功能的影响[J].饲料与畜牧,2018,(5):45-48.  
Hu Y, Yang H L, Sun Y Z. Effects of *Bacillus* cell wall in feed on growth, digestive enzyme activity and immune function of *Epinephelus coioides*[J]. Feed and Animal Husbandry, 2018, (5): 45-48(in Chinese).
- [35] 华雪铭,周洪琪,邱小琼,等.饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J].水产学报,2001,25(5):448-453.  
Hua X M, Zhou H Q, Qiu X C, *et al.* Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast on the growth and disease resistance of allogynogenetic crucian carp[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(5): 448-453(in Chinese).
- [36] 程远,黄凯,黄秀芸,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、免疫力和抗氧化功能的影响[J].动物营养学报,2014,26(6):1503-1512.  
Cheng Y, Huang K, Huang X Y, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and anti-oxidation function of juvenile genetic improvement of farmed tilapia(GIFT, *Oreochromis niloticus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(6): 1503-1512(in Chinese).
- [37] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11)[J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [38] 樊甄姣,刘志鸿,杨爱国,等.Vc对栉孔扇贝体内水解酶和抗氧化酶活性的影响[J].海洋水产研究,2006,27(4):12-16.  
Fan Z J, Liu Z H, Yang A G, *et al.* The effect of vitamin C on the activities of hydrolytic enzymes and antioxidant enzymes of *Chlamys farreri*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(4): 12-16(in Chinese).
- [39] 魏克强,许梓荣.对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究[J].中国兽药杂志,2004,38(9):25-29.  
Wei K Q, Xu Z R. Studies on immune mechanism in shrimp and strategies for disease prevention[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2004, 38(9): 25-29(in Chinese).
- [40] 沈文英,李卫芬,梁权,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能、免疫和抗氧化功能的影响[J].动物营养学报,2011,23(5):881-886.  
Shen W Y, Li W F, Liang Q, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and antioxidant function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(5): 881-886(in Chinese).
- [41] 刘晓勇,张颖,齐茜,等.枯草芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼生长性能、消化酶活性及非特异性免疫的影响[J].中国水产科学,2011,18(6):1315-1320.  
Liu X Y, Zhang Y, Qi Q, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity, and non-specific immunity in hybrid sturgeon (*Acipenser baeri*♂×

- Acipenser schrenkii*♀) juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1315-1320(in Chinese).
- [42] 何瑞鹏, 奉杰, 田相利, 等. 酪酸菌对珍珠龙胆石斑鱼生长、消化酶、血清抗氧化酶和溶菌酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2017, 47(11): 15-23.
- He R P, Feng J, Tian X L, *et al.* Effects of dietary supplementation of *Clostridium butyricum* on the growth and activities of digestive and serum antioxidant enzymes and lysozyme of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. lanceolatus* ♂)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2017, 47(11): 15-23(in Chinese).
- [43] 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.
- [44] 沈文英, 余东游, 李卫芬, 等. 地衣芽孢杆菌对三角帆蚌消化酶活性、免疫指标和抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(1): 95-100.
- Shen W Y, Yu D Y, Li W F, *et al.* Effects of *Bacillus licheniformis* on activities of digestive enzymes, immunological and antioxidant indices of *Hyriopsis cumingii*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(1): 95-100(in Chinese).

**Effect of low-fishmeal diet with *Bacillus subtilis* on growth performance, digestive enzyme activity, antioxidant enzyme activity and its mRNA expression of juveniles *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀**

LI Junliang, YANG Qihui\*, TAN Beiping, DONG Xiaohui,  
CHI Shuyan, LIU Hongyu, ZHANG Shuang  
(Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, Fisheries College,  
Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** The purpose of this experiment was to investigate the effect of low-fishmeal diet with *Bacillus subtilis* on growth performance, digestive enzyme activity, antioxidant enzyme activity and its mRNA expression of juveniles *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀. A total of 720 grouper with average initial weight of (7.00±0.02) g were randomly assigned into 8 groups in triplicates with 30 individuals per replicate. Eight diets were prepared by adding 0 (normal fishmeal control group), 0 (low fishmeal control group), 0.10%, 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00% and 1.25% *Bacillus subtilis* in a diet with low fishmeal (15%), and were formulated by an optimum fishmeal group (35%) as positive control group. The results showed that there was no significant difference in survival rate (SR) among all the treatments. The weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) were increased firstly and then decreased with the *B. subtilis* level increasing. The feed conversion ratio (FCR) in 0.75% group has the lowest value, while the protein efficiency ratio (PER) showed the opposite trend compared to FCR. The activities of trypsin (TRY) and amylase (AMY) firstly increased and then decreased. The activities of serum catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in 0.75% group has the maximum value. The highest CAT and glutathione reductase (GR) mRNA expression in liver of fish were observed in 0.50% and 0.75% group, respectively. Grouper were challenged by *Vibrio harveyi* for the next 7 days, the survival rate of grouper increased significantly with the *B. subtilis* level increasing. It can be concluded that the supplementation of 0.63% *B. subtilis* ( $1.0 \times 10^8$  cfu/mL) can significantly enhance the growth performance, disease resistance, digestive enzymes, serum CAT and SOD activity and mRNA expression related to immunity of grouper, which is estimated with WGR as the evaluation index.

**Key words:** *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀; *Bacillus subtilis*; growth; enzyme activity; mRNA expression

**Corresponding author:** YANG Qihui. E-mail: qihuiyang03@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31772864, 31802316); China Agriculture Research System (CARS-47); Guangdong Provincial Science and Technology Department of Social Development Field of Science and Technology Projects (2013B021100017); Guangdong Provincial Natural Science Foundation (2015A030313621, 2016A030313749); Innovation and Engineering School of Guangdong Province (2015050206)