

文章编号: 1000-0615(2019)04-1162-09

DOI: 10.11964/jfc.20180711348

## Biolog-ECO方法探究饲喂益生菌对凡纳滨对虾肠道微生物代谢及有效作用时间的影响

尚碧娇, 左志晗\*, 李文悦, 邵迎春, 刘逸尘, 孙金生

(天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

**摘要:** 以霍氏肠杆菌(E3)和乳酸菌(R3)2株益生菌对凡纳滨对虾进行为期4周的养殖饲喂实验, 饲喂后期利用Biolog-ECO方法对实验组及空白组的凡纳滨对虾肠道微生物菌群多样性的差异进行比较分析, 以评价益生菌对凡纳滨对虾肠道微生物菌群代谢功能的影响。结果显示, 添加霍氏肠杆菌(E3)或乳酸菌(R3)的实验组, 与空白组相比较, 平均每孔颜色变化率显著上升, 表明益生菌增强了肠道微生物活性; 凡纳滨对虾肠道微生物利用各类碳源的整体能力显著增强, 表明益生菌可以促进水产动物的代谢功能; 肠道微生物多样性指数(包括Shannon、Simpson和McIntosh指数)有明显差异, 表明饲喂2株益生菌可以提高凡纳滨对虾肠道菌群的丰富度。其中, 停喂霍氏肠杆菌后第1天和第5天取样结果表明, Shannon指数显著降低, Simpson和McIntosh指数显著升高; 停喂乳酸菌后的第1天和第5天取样结果表明, Shannon指数无显著差异, Simpson和McIntosh指数显著升高; 二者在第10天取样的结果中均无显著差异, 表明饲料中添加益生菌可以改变凡纳滨对虾肠道内原有菌群的数量和结构, 促进对虾肠道内微生物群落间复杂的相互作用, 进而在维持或者促进对虾健康方面发挥着重要的作用, 同时也表明此两株益生菌在凡纳滨对虾肠道中停留时间最少为5 d。

**关键词:** 凡纳滨对虾; Biolog-ECO方法; 益生菌; 肠道微生物; 多样性指数

**中图分类号:** Q 938.8; S 963.21<sup>+1</sup>

**文献标志码:** A

近年来, 随着凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)集约化养殖程度的提高, 对虾病害的暴发日益严重, 为解决该问题, 抗生素开始应用到水产养殖业中, 而抗生素的大量使用不仅会造成水体污染, 还会引发细菌耐药性的产生。益生菌可以提高水产动物的抗病力, 且无耐药性, 有望替代抗生素, 成为人们日益关注的热点和焦点<sup>[1]</sup>。20世纪末, 具多功能的微生态制剂已开始应用于水产养殖业, 使用微生态制剂既可促进养殖水体中有机污染物降解, 又具有调节、净化水质的作用。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为最常使用的益生菌, 在水产养殖中已被广泛

应用<sup>[2]</sup>。国内外学者对水产养殖中使用益生菌的研究多集中在对功能菌株的筛选、水质净化效果等方面<sup>[3]</sup>, 但是在探究饲喂益生菌添加剂对水产动物肠道内微生物菌群多样性的影响时通常使用较为传统的研究方法。传统的研究方法多通过对对虾肠道的微生物进行分离培养, 对分离出的菌种进行体外研究, 该方法存在诸多弊端, 例如只能分离出有限的微生物种类, 而且分离后微生物的理化特性易随环境变化而改变等<sup>[4]</sup>。

近几年来, 各种基于生物标志物(biomarker)的测定方法(微生物醒法、脂肪酸法等)和分子生物学方法(荧光原位杂交, FISH; 温度梯度凝胶

收稿日期: 2018-07-04 修回日期: 2018-10-01

资助项目: 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目(06202-52K16001); 国家自然科学基金(31472299); 天津市自然科学基金(15JCZDJC33800)

通信作者: 左志晗, E-mail: zhihanzuo@163.com

电泳, TGGE; 变性梯度凝胶电泳, DGGE等)陆续获得了广泛应用<sup>[5]</sup>。这些方法虽无需分离培养这一繁琐环节就可以在一定程度上分析出微生物的群落结构信息, 但却不能看出相关微生物群落总体活性与代谢功能的信息, 而Biolog-ECO检测法则刚好填补了这一缺陷。Biolog-ECO技术主要是通过平均颜色变化率(average well color development, AWCD)和多样性指数等多个指标来分析微生物对31种碳源的利用情况, 从而反映微生物群落代谢功能的多样性特征<sup>[6-7]</sup>。Biolog系统主要包括Biolog微平板、微平板读数器和一套微机系统<sup>[8-10]</sup>。

本研究以饲料中添加乳酸菌(*Lactobacillus*)和霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)2株益生菌为实验组, 以空白组为对照组, 在连续饲喂和养殖凡纳滨对虾4周后, 应用Biolog-ECO方法检测不同组别间凡纳滨对虾肠道微生物菌群多样性的差异, 进而分析饲喂益生菌后凡纳滨对虾肠道微生物菌群代谢功能的变化, 旨在了解与评价益生菌在水产动物养殖中的作用机理与影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

供试凡纳滨对虾由天津市兴盛水产养殖有限公司提供, 乳酸菌R3和霍氏肠杆菌E3均为本实验室前期从健康凡纳滨对虾肠道筛选出来的益生菌, 2株均为兼具抑菌活性及外泌消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)活性的凡纳滨对虾肠道菌株, Biolog-ECO MicroPlate购于美国海沃德Biolog公司。

### 1.2 实验方法

**凡纳滨对虾的饲喂** 实验分为E3、R3和空白对照3个组, 其中E3、R3组分别在饲料中添加霍氏肠杆菌及乳酸菌, 而空白对照组为不含益生菌的相同饲料, 每组2个平行(2个养殖缸内)。每个养殖缸投放250尾体长约为4 cm的凡纳滨对虾幼苗, 按照凡纳滨对虾体质量的5%投放饲料, 其中饲料中的菌液浓度为 $6 \times 10^7$  CFU/mL, 每天投放4次, 连续饲喂4周。

凡纳滨对虾肠道的取样及代谢活性测定分别在停止饲喂益生菌饲料4周后的第1、5、10天进行取样, 每组随机取凡纳滨对虾20尾, 用

75%的酒精体表消毒3 min, 再用0.8%的生理盐水清洗。在无菌状态下解剖, 取出肠道, 加少量0.8%生理盐水于匀浆器中冰浴进行研磨, 匀浆液最终定容至20 mL。将此匀浆液摇匀加样到Biolog-ECO微平板中, 每孔加样150  $\mu$ L, 每样一板(3个重复), 将微平板置于30  $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养, 4 h后用Biolog读数仪读数, 此次读数设为初始值, 之后每隔24 h读数1次, 连续测定6 d。具体参照Classen等<sup>[11]</sup>的方法。

## 2 结果

### 2.1 凡纳滨对虾肠道微生物利用碳源的动力学特征分析

ECO微平板经加样培养后, 记录每孔的吸光度值及其时间变化。31个孔吸光度平均值(average well color development, AWCD)的计算公式:  $AWCD = [\sum(C_i - R)]/31$ , 其中 $C_i$ 为除对照孔外各孔吸光度值,  $R$ 为对照孔吸光度值。AWCD值及其时间变化表示肠道微生物的平均活性。

连续饲喂添加益生菌的饲料4周后, 第1天取样, E3和R3组的AWCD分别与空白组相比差异较大, E3组的凡纳滨对虾肠道微生物AWCD高于R3组(图1-a); 连续饲喂添加益生菌的饲料4周后, 第5天取样, E3和R3组的AWCD均高于空白组, 但E3组的凡纳滨对虾肠道微生物AWCD与R3组基本持平(图1-b)。连续饲喂添加益生菌的饲料4周后第10天取样, 空白组对虾肠道微生物的AWCD与E3组和R3组逐渐趋于一致(图1-c)。根据以上Biolog-ECO板中的平均吸光值(AWCD)的不同, 表明添加益生菌组对虾肠道内微生物在停喂益生菌后, 短期内(至少5 d)仍与空白组有较大差异。综合停止添加益生菌后第1, 5, 10天3次取样的结果显示, E3组、R3组和空白对照组AWCD值均随培养时间的延长呈逐渐增大的趋势, 在加样后培养72 h前增长迅速, 此后逐渐趋于平稳。3次取样中, 在5 d内, 添加益生菌组和空白组的细菌群落均存在一定差异, 表明停喂益生菌后短期内仍有作用, 但是停喂益生菌后第10天肠道逐渐恢复到原有的细菌组成状态, 群落与空白组的差异逐渐趋于一致。表明停止饲喂益生菌后, 对虾肠道内菌群不会立即恢复到原有状态, 而是具有一定的缓冲作用, 逐渐恢复其固有菌群状态, 即连续饲喂益生菌后, 益

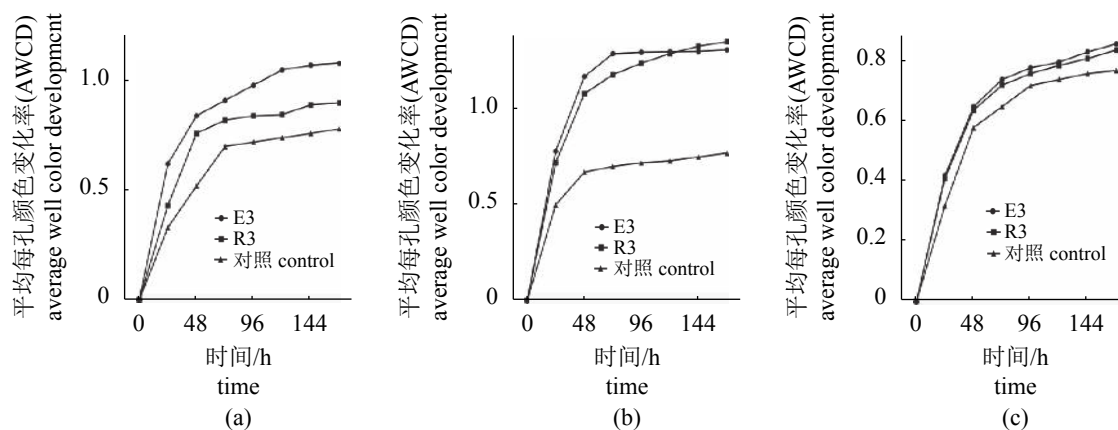


图1 凡纳滨对虾肠道微生物群落AWCD变化曲线

(a) 第1天取样; (b) 第5天取样; (c) 第10天取样

Fig. 1 AWCD curves of intestinal microflora in *L. vannamei*

(a) 1-st day sampling; (b) 5-th day sampling; (c) 10-th day sampling

细菌在对虾肠道内停留时间最少为5 d(本实验显示为5 d)。

## 2.2 凡纳滨对虾肠道微生物群落对各类碳源的利用分析

每块96孔Biolog-ECO微平板上有3组平行, 每组31种碳源, 3个阴性对照, 加入同一样品后, 可以获得3组平行数据。根据碳源的不同官能团, 将Biolog-ECO板的碳源分为6类, 以校正后的数据计算各微生物群落对6类碳源的总吸光度值, 来分析不同处理组微生物群落对同一碳源的利用差异。利用各类碳源总吸光度值除以该类碳源数目所得到的吸光度值来分析同一处理组微生物群落对不同类碳源的利用差异。

在停喂益生菌后第1天取样时, E3组对6类碳源的利用率均明显高于空白组, 对酸类、糖类、氨基酸类利用率最高, 其次为醇类、酯类, 对胺类的利用率最低; R3组除对醇类的利用率与空白组趋于一致外, 对其他5类碳源的利用率明显高于空白组, 对糖类的利用率最高, 其次为氨基酸类和酸类, 对醇类和酯类的利用率较低, 对胺类的利用率最低; 空白组对糖类的利用率最高, 其次为氨基酸类, 对酸类、胺类和酯类的利用率较低, 对醇类的利用率最低(图2)。这表明施用霍氏肠杆菌以及乳酸菌可以强化微生物群落对肠道中酸类、糖类、氨基酸类、醇类、酯类有机物质的降解。霍氏肠杆菌和乳酸菌具有丰富的胞外酶系, 特别是蛋白酶, 有助于降解含氮有机物, 所以在施用霍氏肠杆菌和乳酸

菌后, 加强了酸类、氨基酸类等碳源的利用率。

在停止饲喂益生菌后第5天取样时, E3组和R3组对6类碳源的利用率仍然大于空白组, 其中E3组更为显著, 对各类碳源利用率的高低顺序与第1天取样时趋于一致(图3)。表明停止饲喂益生菌后, 益生菌能在对虾肠道中至少停留5 d, 该结果与对虾肠道微生物利用碳源的动力学特征分析结果相吻合, 这为对虾的实际养殖中投喂益生菌的频率提供了理论参考。

在停止饲喂益生菌后第10天取样时, 在48 h之后, E3和R3组对氨基酸的利用率略高于空白组, E3组对酸类的利用率高于R3组和空白组。除此之外, E3组、R3组和空白组对其他各类碳源的利用率趋于一致(图4)。表明在停止饲喂益生菌10 d后, 3组对虾肠道中的菌群对不同的碳源利用率逐渐趋于一致, 进一步说明益生菌无法长时间在对虾肠道内定殖, 若要达到益生效果, 建议益生菌投喂时间间隔不能超过5 d。

## 2.3 凡纳滨对虾肠道微生物群落代谢多样性分析

多样性是用来描述微生物群落的重要指标, 本研究采用3类多样性指数, 从不同侧面来反映凡纳滨对虾肠道微生物群落代谢多样性, 香农指数(Shannon index)代表物种丰富度; 辛普森指数(Simpson index)又称优势度指数, 反映微生物群落中最常见的物种, 用来评估微生物群落中物种的优势度, 指数越大则多样性越丰富<sup>[12]</sup>; 麦金托什指数(McIntosh index)是对于微生物群落均

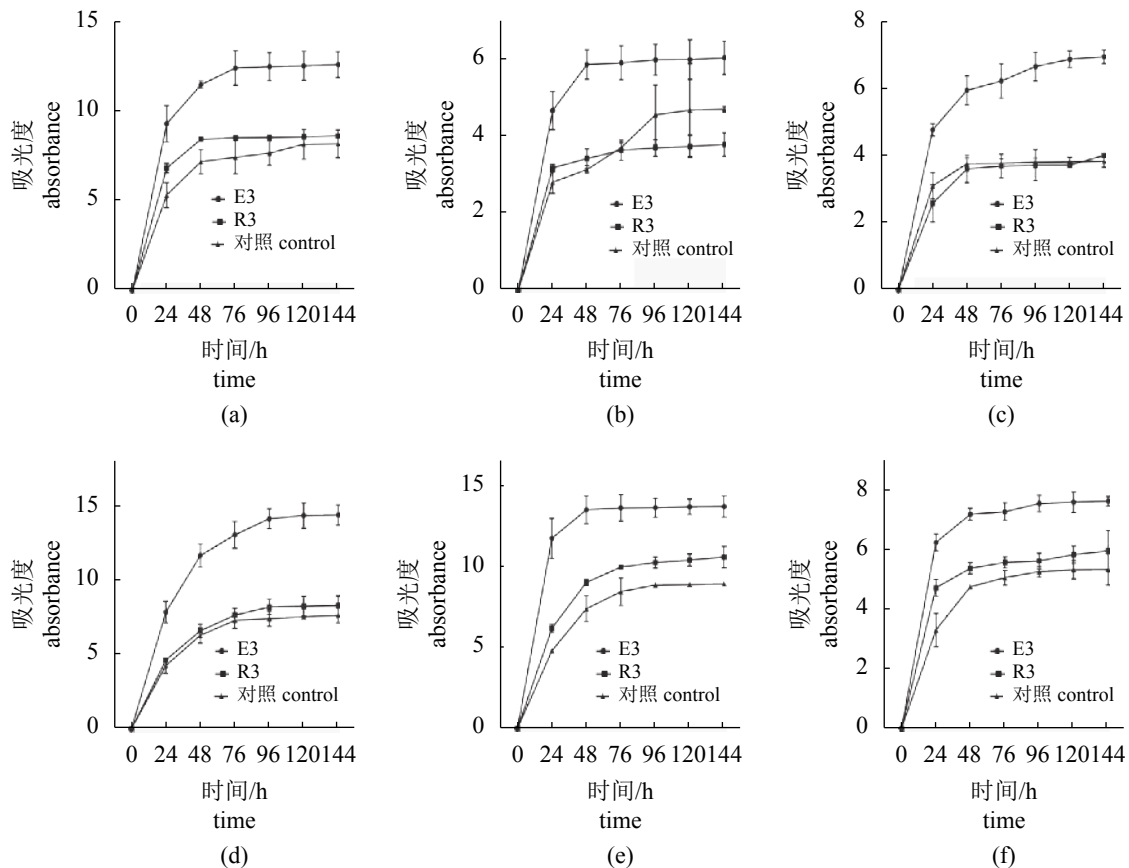


图2 第1天取样, 肠道微生物对各类碳源的利用

(a) 氨基酸类; (b) 胺类; (c) 醇类; (d) 酸类; (e) 糖类; (f) 酯类, 下同

Fig. 2 Sampling on the 1-st day, the utilization of the various carbon sources by intestinal microorganisms

(a) amino acids; (b) amine; (c) alcohols; (d) acids; (e) saccharides; (f) esters, the same below

一性的衡量<sup>[13]</sup>。

采用Biolog-ECO微平板培养96 h的数据, 计算凡纳滨对虾肠道微生物群落代谢功能多样性的Shannon指数、Simpson指数和McIntosh指数。各指数的计算参考杨永华等<sup>[14]</sup>。从肠道微生物群落的多样性指数可以看出, 与空白组相比较, 第1天和第5天取样中, 饲喂霍氏肠杆菌显著降低了凡纳滨对虾肠道微生物群落的Shannon指数( $P < 0.05$ ), 显著提高了Simpson指数和McIntosh指数( $P < 0.05$ ), 第10天取样中无显著差异; 饲喂乳酸菌对凡纳滨对虾肠道微生物群落Shannon指数无显著影响, 但是显著提高了Simpson指数和McIntosh指数( $P < 0.05$ ), 第10天取样中无显著差异(表1)。综合上述结果分析, 饲喂霍氏肠杆菌对凡纳滨对虾肠道群落功能多样性的影响大于饲喂乳酸菌。可能是随着饲喂时间的延长, 霍氏肠杆菌和乳酸菌在凡纳滨对虾肠道中不断增多, 改变了原有的肠道菌群结构, 逐渐成为了较优势的

菌群, 但是在停喂益生菌10 d后, 实验组对虾肠道菌群又逐渐恢复到固有状态, 与空白组肠道微生物菌群多样性无显著差异。从多样性的角度再次证明了2株益生菌不会在对虾肠道中长时间停留, 益生菌施用过程中, 为保证益生效果, 投喂间隔时间最好不要超过5 d。

### 3 讨论

Biolog方法是20世纪80年代末美国Biolog公司创建的, 起初被用来鉴定纯种微生物。近年来, 生物学家在土壤方面的微生物群落的相关研究中采用Biolog技术<sup>[15]</sup>, 该技术有助于提高生物反应的灵敏度, 并帮助研究者能够更加清楚地分辨这些变化。研究者在Biolog技术的支持下可以清晰地记录生物反应的相关数据, 并在计算机中存储研究数据, 相较于传统方法具有很大的优势。Biolog技术如今多用于鉴定环境和土壤中的微生物群落, 包括细菌、酵母菌和霉

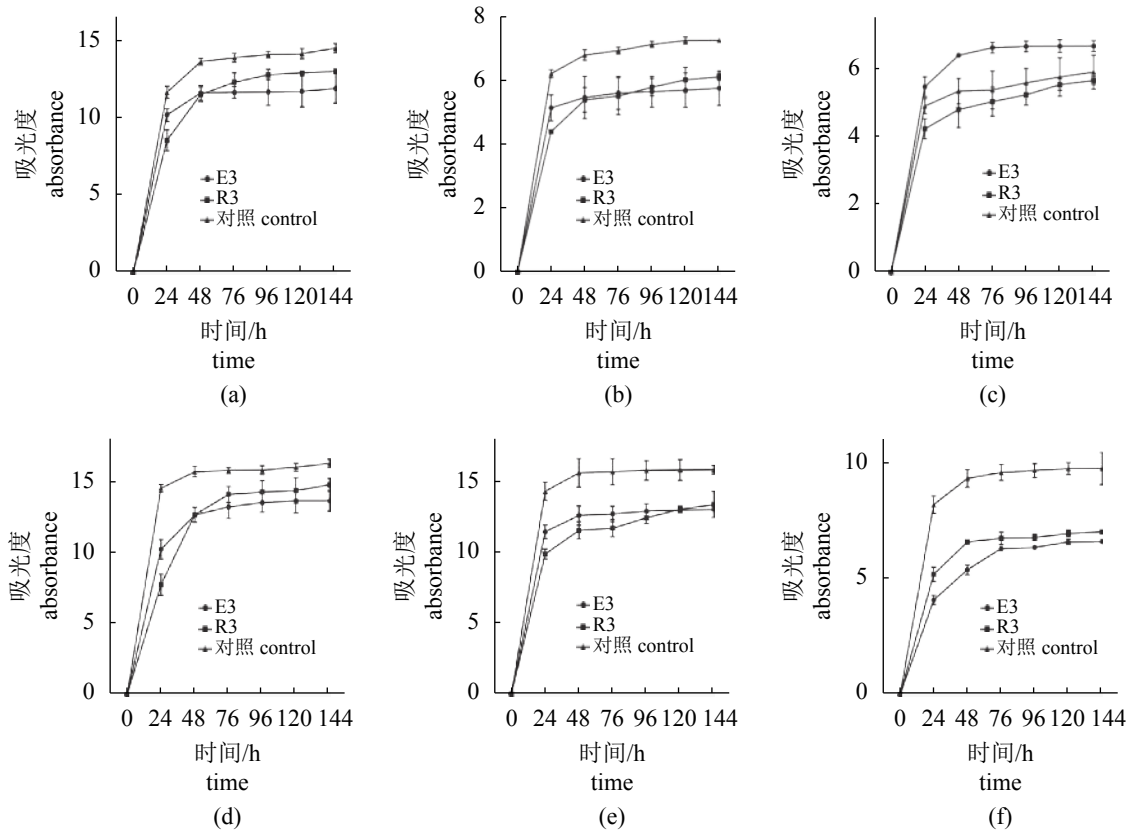


图3 第5天取样, 肠道微生物对各类碳源的利用

Fig. 3 Sampling on the 5-th day, the utilization of the various carbon sources by intestinal microorganisms

菌等<sup>[16-20]</sup>, 在水产养殖体系中的应用主要集中在养殖水体和养殖池底泥中微生物群落的研究。李志斐等<sup>[21]</sup>基于Biolog-ECO技术分析了杂交鳢和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)高产池塘水体中微生物碳代谢的特征, 而益生菌饲喂水产动物后关于其肠道微生物菌群变化的研究目前应用的很少。

本实验选用霍氏肠杆菌和乳酸菌2株益生菌对凡纳滨对虾进行了为期4周的养殖饲喂实验, 利用Biolog-ECO方法对停止饲喂益生菌后不同时间点的实验组及空白组凡纳滨对虾肠道微生物群落进行比较分析, 通过平均每孔颜色变化率, 利用差异性曲线和多样性指数(香农指数、辛普森指数、麦金托什指数)等多个指标来分析凡纳滨对虾肠道微生物对31种碳源的具体利用情况, 以评价益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群多样性及代谢功能的影响, 并探究了2种益生菌在凡纳滨对虾肠道内的停留时间。

薛俊敬等<sup>[22]</sup>提出饲料中添加益生菌可以显著促进草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的生长, 增

强饲料利用率和机体免疫力并提高糖和脂肪代谢水平; 马悦欣等<sup>[23]</sup>的研究表明, 混合益生菌可以促进幼参生长和消化酶活性, 并影响其体壁粗蛋白和糖分含量。而本实验是利用新颖的Biolog-ECO方法探究对虾肠道微生物群落对各类碳源的利用, 结果显示, 被添加到饲料中的霍氏肠杆菌和乳酸菌均能显著提高凡纳滨对虾肠道微生物活性; 施用益生菌可以强化肠道微生物群落对肠道中胺类、酸类、糖类、氨基酸类、醇类和酯类有机物质的降解, 从而加速了对虾肠道对于各类碳源的吸收和利用。这可能与此2株益生菌均兼具抑菌活性及外泌消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)活性的特质有关, 从而有助于降解含氮有机物, 加速对各类碳源的代谢能力, 为益生菌可以应用于水产动物的养殖提供了又一微观机理。

曾占壮<sup>[24]</sup>将枯草芽孢杆菌和少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)分别添加到日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)饲料中, 利用传统的细菌分离培养技术和全自动菌落分析仪观察和研究

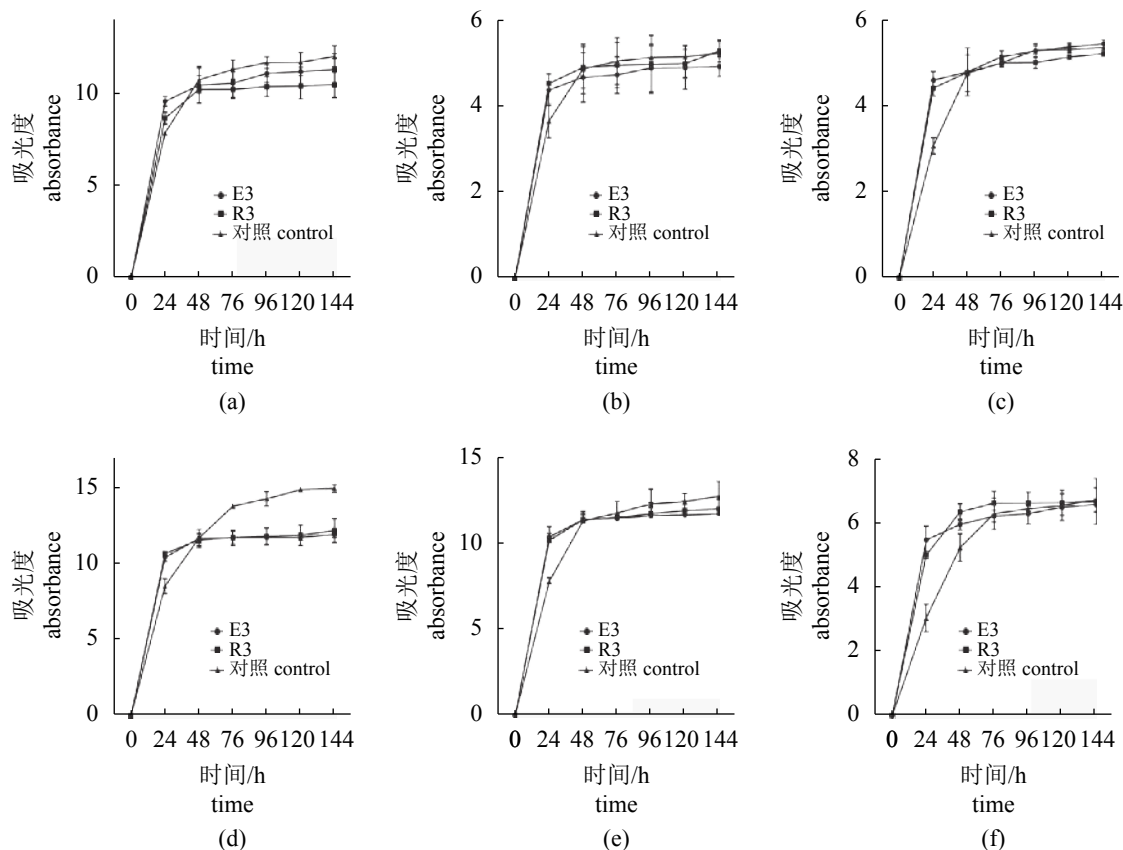


图 4 第10天取样, 肠道微生物对各类碳源的利用

Fig. 4 Sampling on the 10-th day, the utilization of the various carbon sources by intestinal microorganisms

表 1 肠道微生物群落多样性指数

Tab. 1 The microbial community functional diversity index

取样时间 sampling time	实验组别 experimental groups	多样性指数 diversity indices		
		香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	麦金托什指数 McIntosh index
第1天取样 1-st sampling	E3	3.050±0.033*	56.697±0.876*	6.046±0.331*
	R3	3.413±0.231	62.801±0.221*	5.403±0.562*
	对照 control	3.363±0.017	38.393±0.289	4.012±0.389
第5天取样 5-th sampling	E3	3.155±0.272*	82.314±0.223*	7.931±0.291*
	R3	3.394±0.013	79.949±0.086*	8.091±0.023*
	control	3.364±0.103	69.328±0.381	3.949±0.048
第10天取样 10-th sampling	E3	3.293±0.031	91.556±0.852	6.492±0.212
	R3	3.304±0.129	97.015±0.496	6.474±0.539
	对照 control	3.308±0.059	94.050±0.344	6.324±0.542

注: \* 表示实验组与对照组之间差异显著( $P<0.05$ ); 数值均为平均值±标准差,  $n=3$

Notes: \*. the difference between the experimental pool and the control pool was significant ( $P<0.05$ ); numbers were mean±SD,  $n=3$

其在鳃鳃肠胃中的定殖与演替, 结果显示, 枯草芽孢杆菌在胃内定殖时间大于7 d, 在肠道内定殖时间大于17 d; 少动鞘氨醇单胞菌在胃内定

殖时间大于4 d, 在肠道内定殖时间大于9 d, 实验菌株均能在鳃鳃肠胃中短时间定殖。而本实验使用的Biolog-ECO方法无需分离培养这一繁琐

环节就可以在在一定程度上分析微生物的群落结构信息,而且能获得相关微生物群落总体活性与代谢功能的信息。其中,停止饲喂益生菌后第1和第5天取样中,益生菌组和空白组相比,生物多样性指数存在明显差异,但第10天取样结果显示,3组对虾肠道中的3种指数已无显著差异,且比较2实验组数据可以得出,饲喂霍氏肠杆菌对凡纳滨对虾肠道群落功能多样性的影响大于饲喂乳酸菌组。由此推测,饲料中添加的益生菌在饲喂过程中会短期在肠道中定殖,改变肠道内原有菌群的数量和结构,促进对虾肠道内微生物群落间的相互作用,进而在维持或者促进对虾健康方面发挥重要的作用。但若益生菌停喂时间过久,凡纳滨对虾肠道微生物菌群便会逐渐恢复至其初始状态。上述结果说明饲料中添加益生菌对水产动物肠道内菌群的影响具有一定的时效性,当超过益生菌定殖周期后,菌群的组成会逐渐恢复至固有状态,此为益生菌在水产养殖中的应用提供了又一参考依据。

#### 参考文献:

- [1] Lu L, Tan H X, Luo G Z, *et al.* The effects of *Bacillus subtilis* on nitrogen recycling from aquaculture solid waste using heterotrophic nitrogen assimilation in sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 180-185.
- [2] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用[J]. *土壤*, 2001, 33(2): 92-97.  
Zhang H Y, Li Z G. Soil bacilli and their sustainable application[J]. *Soil*, 2001, 33(2): 92-97(in Chinese).
- [3] Afric R F. Review probiotics in man and animal[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66(5): 365-378.
- [4] 党雯, 郗春花, 张强, 等. Biolog法测定土壤微生物群落功能多样性预处理方法的筛选[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(2): 153-158.  
Dang W, Gao C H, Zhang Q, *et al.* Screening of pre-processing methods of Biolog for soil microbial community functional diversity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(2): 153-158(in Chinese).
- [5] 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法[J]. *农业环境保护*, 1997, 16(6): 252-256, 265.  
Bai Q Y. Chemical evaluation method of soil microbial community structure[J]. *Agro-Environmental Protection*, 1997, 16(6): 252-256, 265(in Chinese).
- [6] Liu L Y, Mi J D, Wang Y, *et al.* Different methods of incorporating ciprofloxacin in soil affect microbiome and degradation of ciprofloxacin residue[J]. *The Science of the total environment*, 2018, 619-620: 1673-1681.
- [7] 江鑫钰, 王江峰, 朱光辉, 等. Biolog-Eco法检测尸体微生物群落的代谢功能变化[J]. *法医学杂志*, 2016, 32(3): 171-175, 179.  
Jiang X Y, Wang J F, Zhu G H, *et al.* Detection of metabolism function of microbial community of corpses by Biolog-Eco method[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2016, 32(3): 171-175, 179(in Chinese).
- [8] Xun Y, Zhang X J, Chen C L, *et al.* Comprehensive evaluation of soil near uranium tailings, Beishan City, China[J]. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2018, 100(3): 843-848.
- [9] Zhang H F, Li G, Song X L, *et al.* Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(1): 38-44.
- [10] Jiang Z, Ping L, Wang Y H, *et al.* Effects of roxarsone on the functional diversity of soil microbial community[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 76: 32-35.
- [11] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, *et al.* Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(3): 319-328.
- [12] 马克平, 黄建辉, 于顺利, 等. 北京东灵山地区植物群落多样性的研究: II 丰富度、均匀度和物种多样性指数[J]. *生态学报*, 1995, 15(3): 268-277.  
Ma K P, Huang J H, Yu S L, *et al.* Plant community diversity in Dongling Hill, Beijing, China: II. Species richness, evenness and species diversities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1995, 15(3): 268-277(in Chinese).
- [13] 李志斐, 王广军, 谢骏, 等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢Biolog分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 1985-1995.  
Li Z F, Wang G J, Xie J, *et al.* Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 1985-1995(in Chinese).
- [14] 杨永华, 姚健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功

- 能多样性的影响[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23-25, 47.
- Yang Y H, Yao J, Hua X M. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil[J]. Journal of Microbiology, 2000, 20(2): 23-25, 47(in Chinese).
- [15] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [16] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456-461.
- Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, *et al.* Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity[J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(3): 456-461(in Chinese).
- [17] 韩蕙, 翟振华, 张燕燕, 等. 环境微生物样品真菌群落 BIOLOG分析方法[J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2368-2373.
- Han H, Zhai Z H, Zhang Y Y, *et al.* BIOLOG analysis for fungal communities in environmental samples[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(5): 2368-2373(in Chinese).
- [18] 贾夏, 董岁明, 周春娟. 微生物生态研究中Biolog Eco微平板培养时间对分析结果的影响[J]. 应用基础与工程科学学报, 2013, 21(1): 10-19.
- Jia X, Dong S M, Zhou C J. Effects of Biolog Eco-plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches[J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2013, 21(1): 10-19(in Chinese).
- [19] 童桂香, 韦信贤, 黎小正, 等. BIOLOG自动微生物鉴定系统在水产动物病原菌检测中的应用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 7846-7848.
- Tong G X, Wei X X, Li X Z, *et al.* Application of BIOLOG automatic microbiological assay system in the detection of aquatic animals pathogen[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2011, 39(13): 7846-7848(in Chinese).
- [20] 王强, 戴九兰, 吴大千, 等. 微生物生态研究中基于 BIOLOG方法的数据分析[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 817-823.
- Wang Q, Dai J L, Wu D Q, *et al.* Statistical analysis of data from BIOLOG method in the study of microbial ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 817-823(in Chinese).
- [21] 李志斐, 谢骏, 郁二蒙, 等. 基于Biolog-ECO技术分析杂交鳢和大口黑鲈高产池塘水体微生物碳代谢特征[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(1): 185-192.
- Li Z F, Xie J, Yu E M, *et al.* Carbon metabolic diversity of microbial communities in intensive ponds for hybrid snakehead and largemouth bass based on Biolog-ECO plates[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(1): 185-192(in Chinese).
- [22] 薛俊敬, 胡宝庆, 文春根, 等. 益生菌对草鱼幼鱼生长、免疫和营养代谢的影响[C]//2017年中国水产学会学术年会论文摘要集. 南昌: 中国水产学会, 2017: 1.
- Xue J J, Hu B Q, Wen C G, *et al.* Effects of probiotics on growth, immunity and nutritional metabolism of juvenile grass carp[C]//Abstract of the academic Annual meeting of the Chinese Fisheries Society in 2017. Nanchang: Chinese Fisheries Society, 2017: 1(in Chinese).
- [23] 马悦欣, 包鹏云, 李璐瑶, 等. 饲料中添加益生菌对幼参生长、消化酶活力和体成分的影响[C]//2017年中国水产学会学术年会论文摘要集. 南昌: 中国水产学会, 2017: 1.
- Ma Y X, Bao P Y, Li L Y, *et al.* Effects of probiotics on growth, digestive enzyme activity and body composition of juvenile ginseng[C]//Abstract of the Academic Annual Meeting of the Chinese Fisheries Society in 2017. Nanchang: Chinese Fisheries Society, 2017: 1(in Chinese).
- [24] 曾占壮. 2株益生菌在鳗鲡消化道内的定植与演替[J]. 福建农业学报, 2010, 25(1): 23-26.
- Zeng Z Z. Colonization and succession of two probiotic microorganisms in eel[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2010, 25(1): 23-26(in Chinese).



## Effects of probiotics on intestinal microbial metabolism and effective action time of *Litopenaeus vannamei* by Biolog-ECO

SHANG Bijiao, ZUO Zhihan\*, LI Wenyue, SHAO Yingchun, LIU Yichen, SUN Jinsheng  
(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract:** In this experiment, two strains of probiotics, i.e. *Enterobacter hormaechei* (E3) and *Lactobacillus* (R3) were used to feed *Litopenaeus vannamei* for 4 weeks. The diversity of intestinal microflora of *L. vannamei* in experimental group and blank group was compared and analyzed by Biolog-ECO method in the later period of feeding, in order to evaluate the effect of probiotics on the metabolic function of intestinal microflora of *L. vannamei*. The results showed that AWCD in the experimental group was significantly higher than that in the blank group, indicating that probiotics enhanced the intestinal microbial activity; the ability of intestinal microorganisms to utilize carbon source was significantly enhanced, which indicated that the digestive enzyme secreted by probiotics increased the digestibility and absorption rate of prawn feed, thus promoting the rapid growth of *L. vannamei*. There were significant differences in intestinal microbial diversity index (including Shannon, Simpson and McIntosh indexes), which indicated that different strains had different effects on intestinal microflora richness of *L. vannamei*. The results of sampling on the 1st and 5th day after stopping adding *E. hormaechei* showed that Shannon index decreased significantly and Simpson index and McIntosh index increased significantly, and lactic acid bacteria was stopped from adding. The results of sampling on the 1st and 5th day showed that there was no significant difference in Shannon index and McIntosh index, but there was no significant difference between them on the 10th day. The results showed that the addition of probiotics to the feed could change the number and structure of the original microflora in the intestinal tract of *L. vannamei* and promote the complex interaction between the microbial communities in the intestinal tract of *L. vannamei*. In turn, it plays an important role in maintaining or promoting the health of *L. vannamei*. It also showed that the two probiotics should stay in the intestines of aquatic animals for at least 5 days.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; Biolog-ECO method; probiotics; intestinal microorganism; diversity index

**Corresponding author:** ZUO Zhihan. E-mail: zihanzuo@163.com

**Funding projects:** Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship (06202-52K16001); National Natural Science Foundation of China (31472299); Natural Science Foundation of Tianjin (15JCZDJC33800)