



# 读书报告

吴胜奎

2019.7.7






AQUACULTURE **2019**  
**REPORT**

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Selection of carbohydrate-active probiotics from the gut of carnivorous fish fed plant-based diets

Cláudia R. Serra <sup>1</sup>, Eduarda M. Almeida<sup>2,3</sup>, Inês Guerreiro<sup>1,2</sup>, Rafaela Santos <sup>1,2</sup>, Daniel L. Merrifield<sup>4</sup>, Fernando Tavares <sup>2,3</sup>, Aires Oliva-Teles<sup>1,2</sup> & Paula Enes<sup>1</sup>

Received: 4 February 2019

Accepted: 25 March 2019

Published online: 23 April 2019



# CONTENTS

01

研究背景

---

02

材料方法

---

03

结果

---

04

讨论

---

05

收获

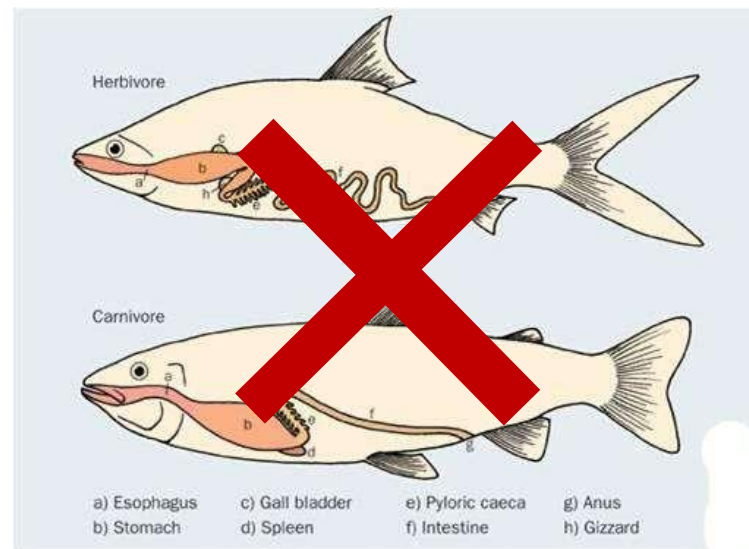
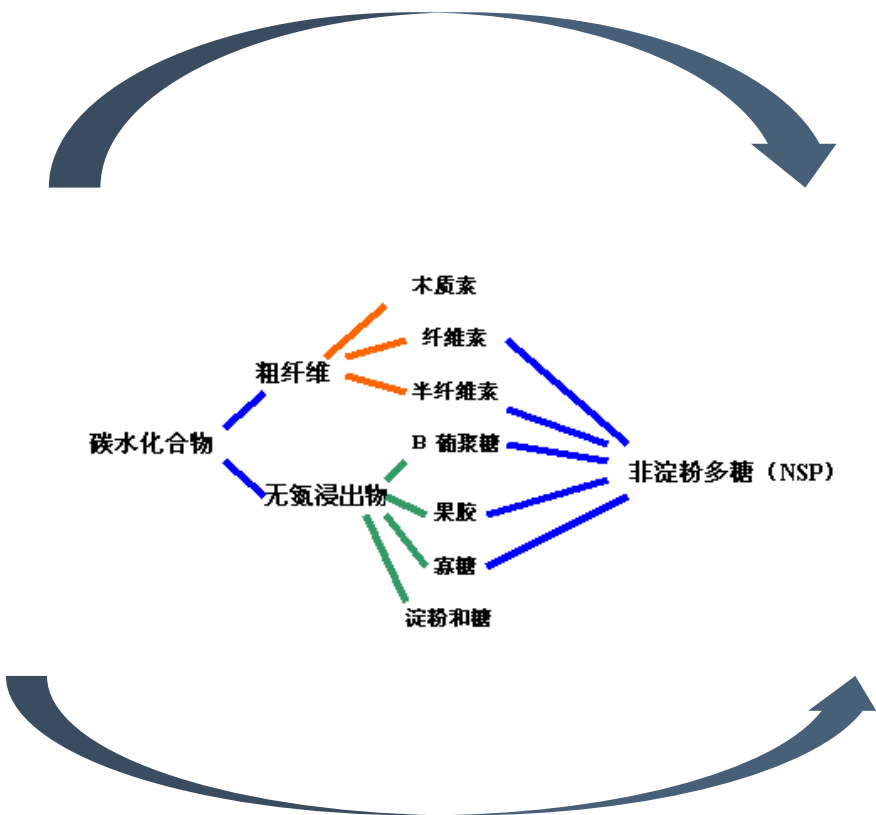


# 研究背景

# 背景

鱼类营养对鱼粉的依赖是一种有机污染物的来源。

鱼粉最明显的可持续替代品是植物饲料，但其营养价值受到高水平非淀粉多糖（NSP）的限制，这些非淀粉多糖不会被鱼类代谢。





# 材料方法

# 技术路线

四种饲料 (CTR, SBM, RSM和SFM) 饲喂欧洲鲈鱼 (34.4g) 45天

禁食24h,每桶3条鱼, 取肠内容物, 梯度稀释, 涂布在LB培养基, 鉴定孢子的产生。保存

筛选可以利用碳水化合物的菌株

益生菌分离株  
的分类鉴定

产NSPases  
的筛选

生物安全试验

抗菌活性筛  
选试验

孢子形成和肠道  
环境抗性

分离到两株菌落F199和F162

# 技术路线

五种饲料 (CTR- , FI99 , FI162, Mix, CTR+) , 饲喂欧洲鲈鱼 (29.0g) 9周

实验结束后, 测量体重

10<sup>9</sup>个孢子/g饲料的  
FI99, FI162和两者混  
合物

检测生长性能和饲料利用率

对最终体重有积极作用, 饲料效率和蛋白质效率接近于FM的饮食 (CTR +)





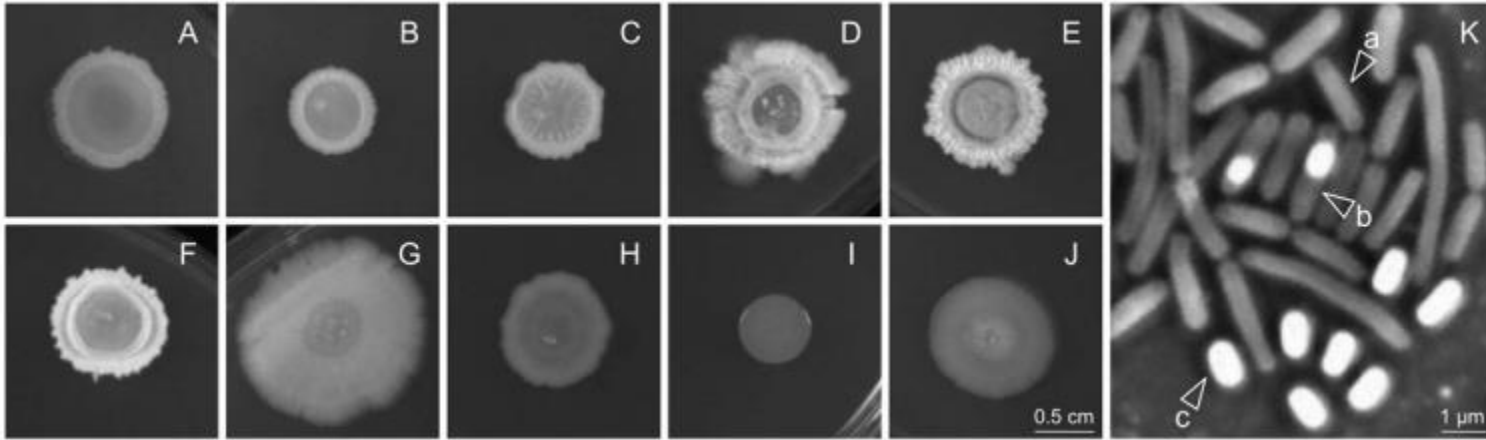
# 结果

Diets <sup>a</sup>	1st Trial Diets				2 <sup>nd</sup> Trial Diets				
	CTR	SBM	RSM	SFM	CTR-	FI99	FI162	Mix	CTR+
<b>Ingredients (% dry weight)</b>									
Fish meal <sup>b</sup>	60.2	38.7	45.2	48.1	5.0	5.0	5.0	5.0	24.5
Fish protein concent <sup>c</sup>	—	—	—	—	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Pea protein concent <sup>d</sup>	—	—	—	—	4.2	4.2	4.2	4.2	5.0
Soy bean meal <sup>e</sup>	—	30.0	—	—	20.0	20.0	20.0	20.0	10.0
Rapeseed meal <sup>f</sup>	—	—	30.0	—	10.0	10.0	10.0	10.0	—
Sunflower meal <sup>g</sup>	—	—	—	30.0	—	—	—	—	—
Wheat meal <sup>h</sup>	—	—	—	—	8.2	8.2	8.2	8.2	20.0
Wheat gluten <sup>i</sup>	—	—	—	—	10.0	10.0	10.0	10.0	5.0
Corn gluten <sup>j</sup>	—	—	—	—	15.0	15.0	15.0	15.0	10.0
Pregelat. maize starch <sup>k</sup>	23.2	11.6	8.0	4.8	—	—	—	—	—
Fish oil	12.1	13.6	12.4	13.0	14.6	14.6	14.6	14.6	13.0
Bicalcium phosphate <sup>l</sup>	1.0	2.6	1.0	0.6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.5
Choline chloride (50%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin premix <sup>m</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral premix <sup>n</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Binder <sup>o</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-lysine <sup>p</sup>	—	—	—	—	0.6	0.6	0.6	0.6	—
L-methionine <sup>p</sup>	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4
Taurine <sup>p</sup>	—	—	—	—	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
<b>Proximate analysis (% dry weight)</b>									
Dry matter	91.5	92.4	92.7	93.5	91.5	92.0	92.0	91.0	92.6
Crude protein	46.9	46.5	46.3	46.4	44.9	46.5	45.7	46.3	44.9
Crude lipids	17.3	16.1	16.6	16.8	18.1	18.7	18.5	17.8	17.8
Ash	11.3	11.7	11.3	11.1	8.2	8.0	8.0	8.2	8.7

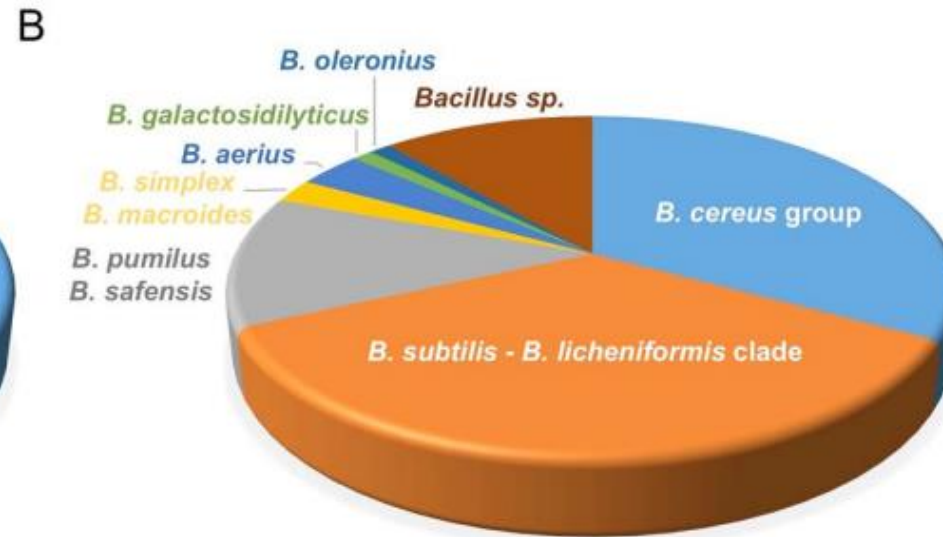
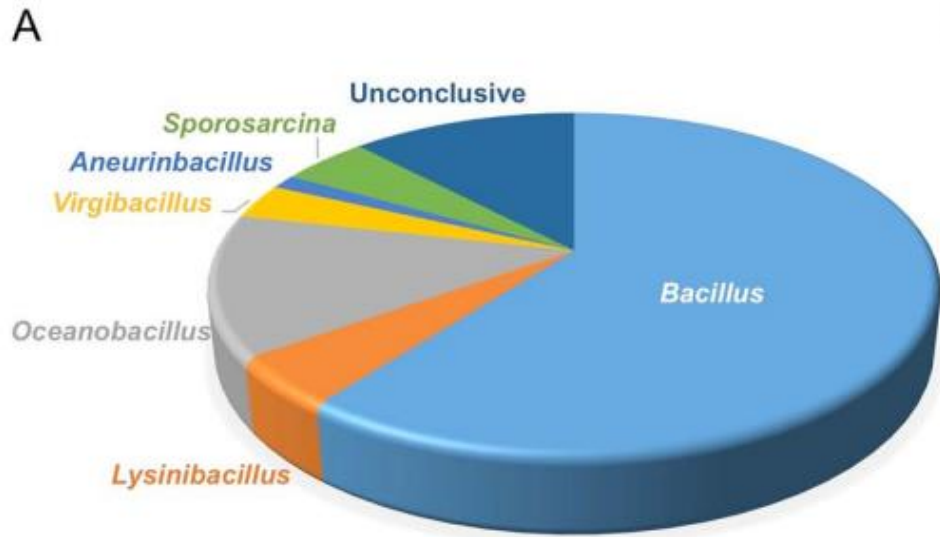
## 饲料配方

在第一个试验中，三种实验饮食配制成等氮（47%粗蛋白），（17%粗脂质）对于第二次试验，将五种实验饮食配制成46%粗蛋白和18%粗脂肪

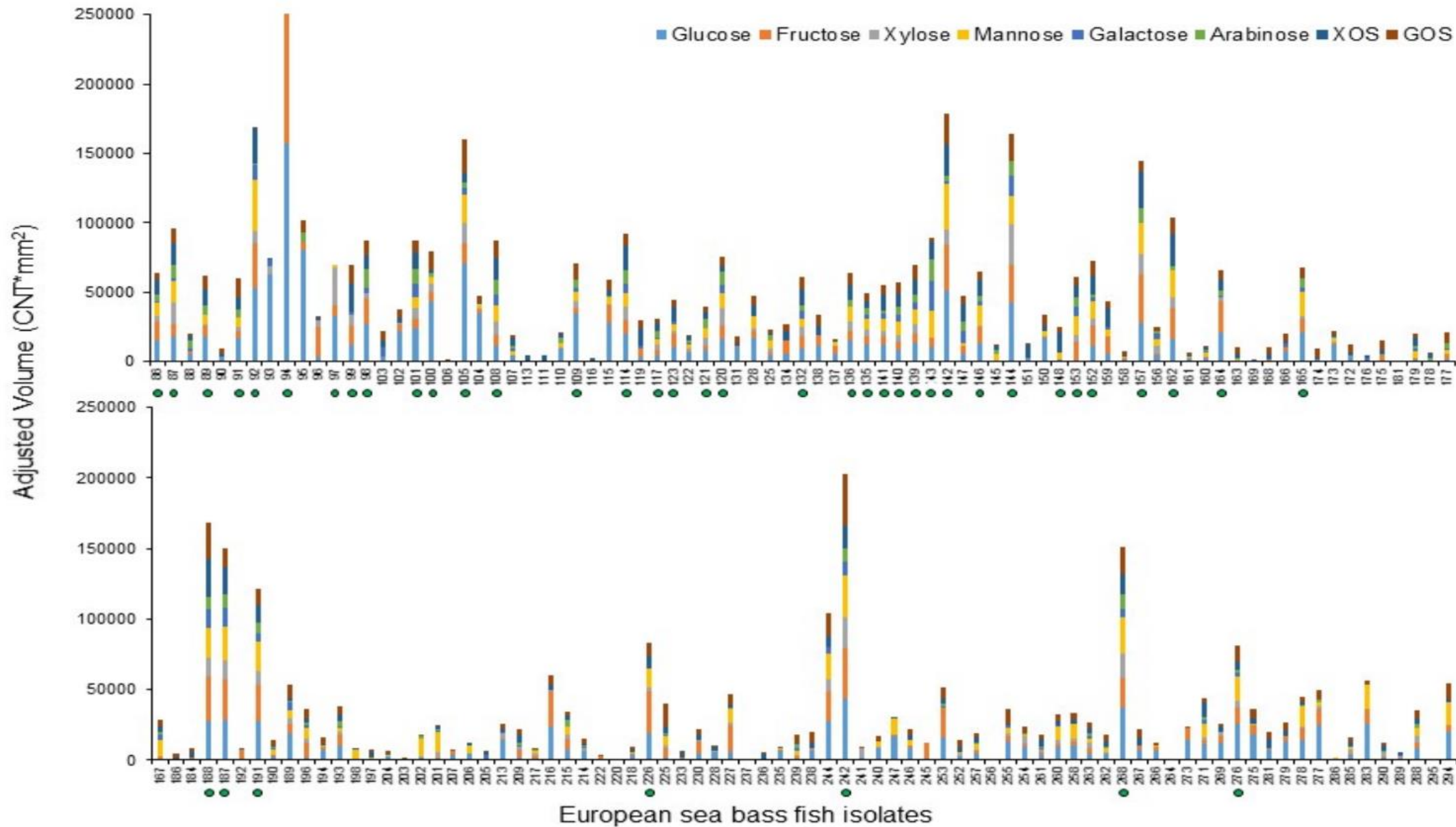
# 肠道孢子的分离与鉴定



LB中生长24h的菌落的照片。  
K描绘了不同发育阶段的孢子囊(A)营养细胞, (B)前孢子 (C)游离孢子。



欧洲鲈鱼肠内容物中优势 (60%) 的芽孢杆菌属。



Isolate <sup>a</sup>	Diet <sup>b</sup>	Spores <sup>c</sup>	Catalase <sup>d</sup>	Hemolysis <sup>e</sup>	AbR <sup>f</sup>	16S rRNA sequence analysis	
						Closest known species <sup>g</sup>	% ID
<u>FI86</u>	CTR	+	+	β	—	<i>B. thuringiensis; B. cereus</i>	100
<b>FI87</b>	CTR	+	+	γ	—	<i>Bacillus sp.</i>	99.2
<b>FI89</b>	CTR	+	+	γ	—	<i>B. subtilis</i>	98.2
<u>FI91</u>	SFM	+	+	β	—	<i>B. cereus</i>	100
<b>FI92</b>	SFM	+	+	α	—	<i>B. pumilus; B. safensis</i>	100
<u>FI94</u>	SFM	+	+	α	MR	<i>B. licheniformis</i>	100
<u>FI97</u>	SFM	+	+ \ -	β	—	<i>B. cereus</i>	100
<u>FI98</u>	SFM	+	+	β	—	<i>B. simplex; B. macroides</i>	100
<b>FI99</b>	SFM	+	+	α	—	<i>B. subtilis; B. licheniformis</i>	100
<u>FI100</u>	SBM	+	+	β	R	<i>B. sp</i>	99.2
<u>FI101</u>	SBM	+	+	α	R	<i>B. safensis</i>	99.8

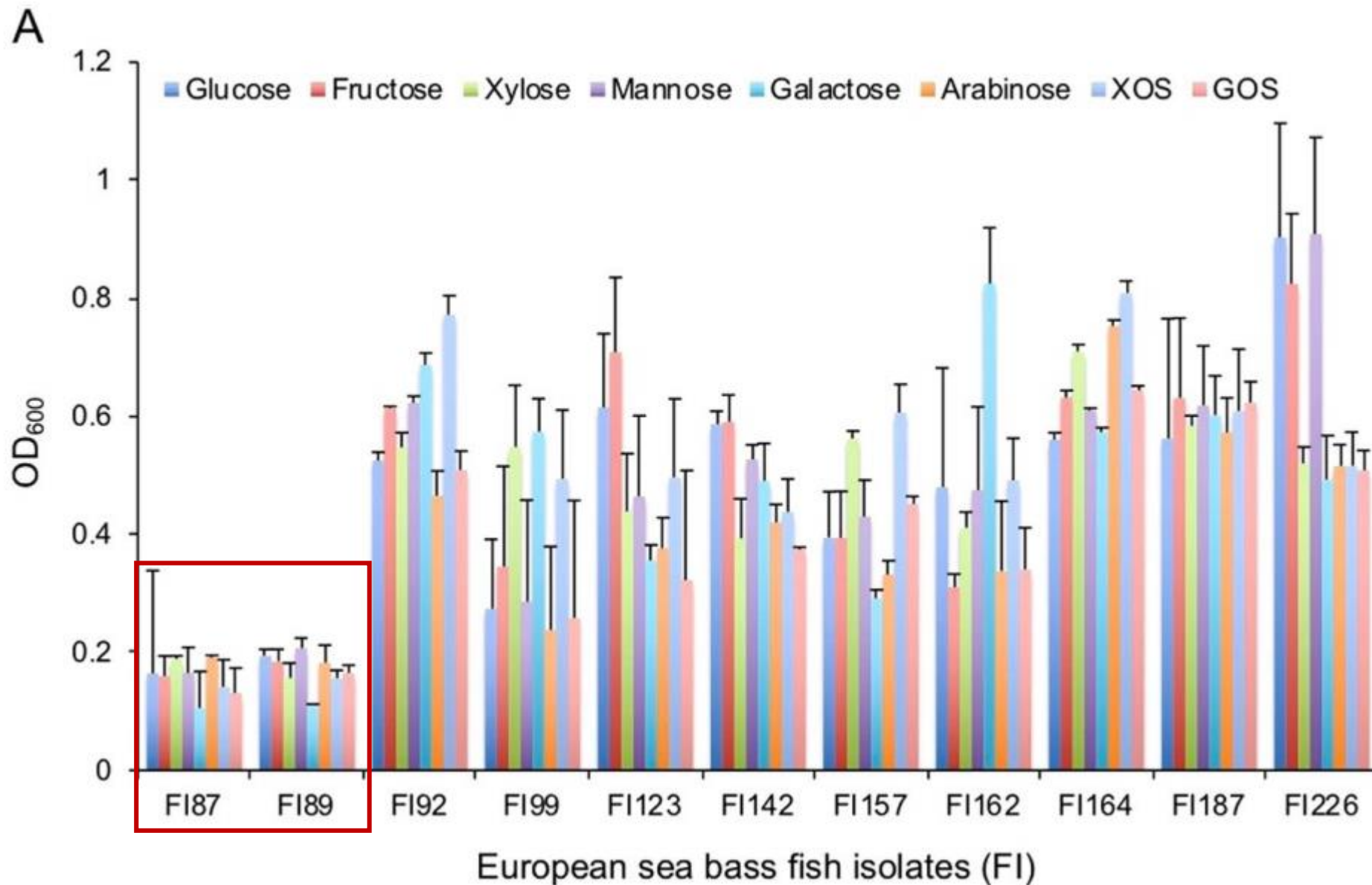
<b>FI187</b>	SFM	+	+	γ	—	<i>Bacillus sp.</i>	99.5
<b>FI191</b>	SFM	+	+	γ	R	<i>Bacillus sp.</i>	100
<b>FI226</b>	RSM	+	+	α	—	<i>Bacillus sp.</i>	98.7
<b>FI242</b>	SFM	+	+	γ	R	<i>B. licheniformis</i>	100
<b>FI268</b>	SBM	+	+	γ	R	<i>B. licheniformis</i>	100
<b>FI276</b>	RSM	+	+	β	—	<i>B. thuringiensis; B. cereus</i>	100

FI268	48	0.19	0.25	1.5	1.5	0.38	4
FI276	4	0.5	0.125	4	3	0.38	1.5

<sup>a</sup> MICs were determined by the Etest® method and in grey boxes are the MIC values above the reference breakpoint (EFSA-FEEDAP, 2012). CL, Cloramphenicol; TC, Tetracyclin, EM, Erythromycin; KM, Kanamycin; VA, Vancomycin; GM, Gentamycin; SM, Streptomycin.

<sup>b</sup> Highlighted in underlined lettering are the isolates showing resistance to 2 or more antimicrobials. All isolates showing any antimicrobial resistance were discarded from the rest of the study.

# 碳水化合物利用率



选取11株菌体，  
同时在M9液体  
培养基中培养和  
添加不同碳水化  
合物的M9液体  
中培养24 h，菌  
体生长情况

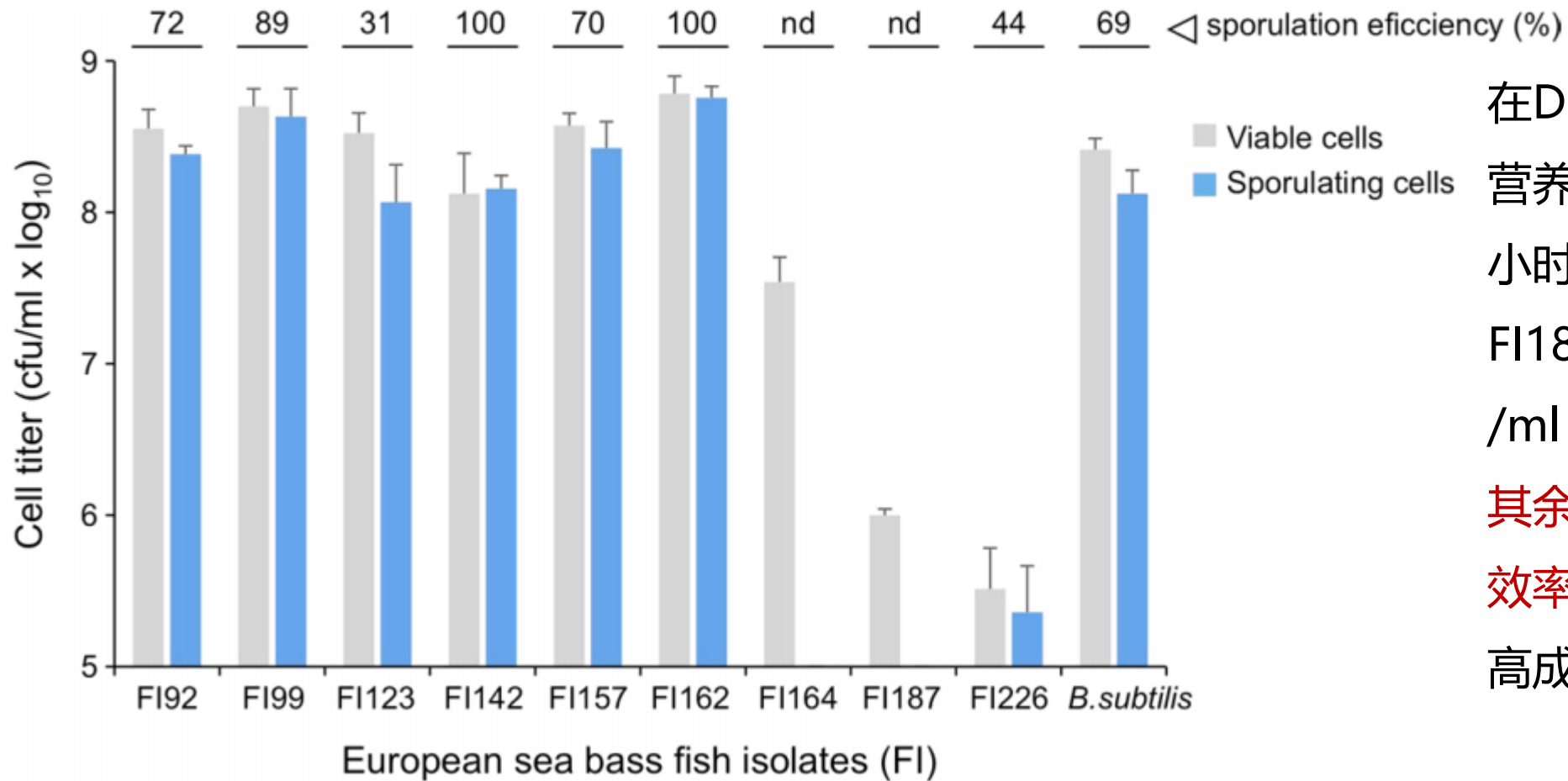
# 相关酶基因的鉴定

B



最有希望的菌株（FI187和FI226）没有获得PCR扩增，而所有目标基因似乎都存在于最差的鱼类分离株FI87和FI89中

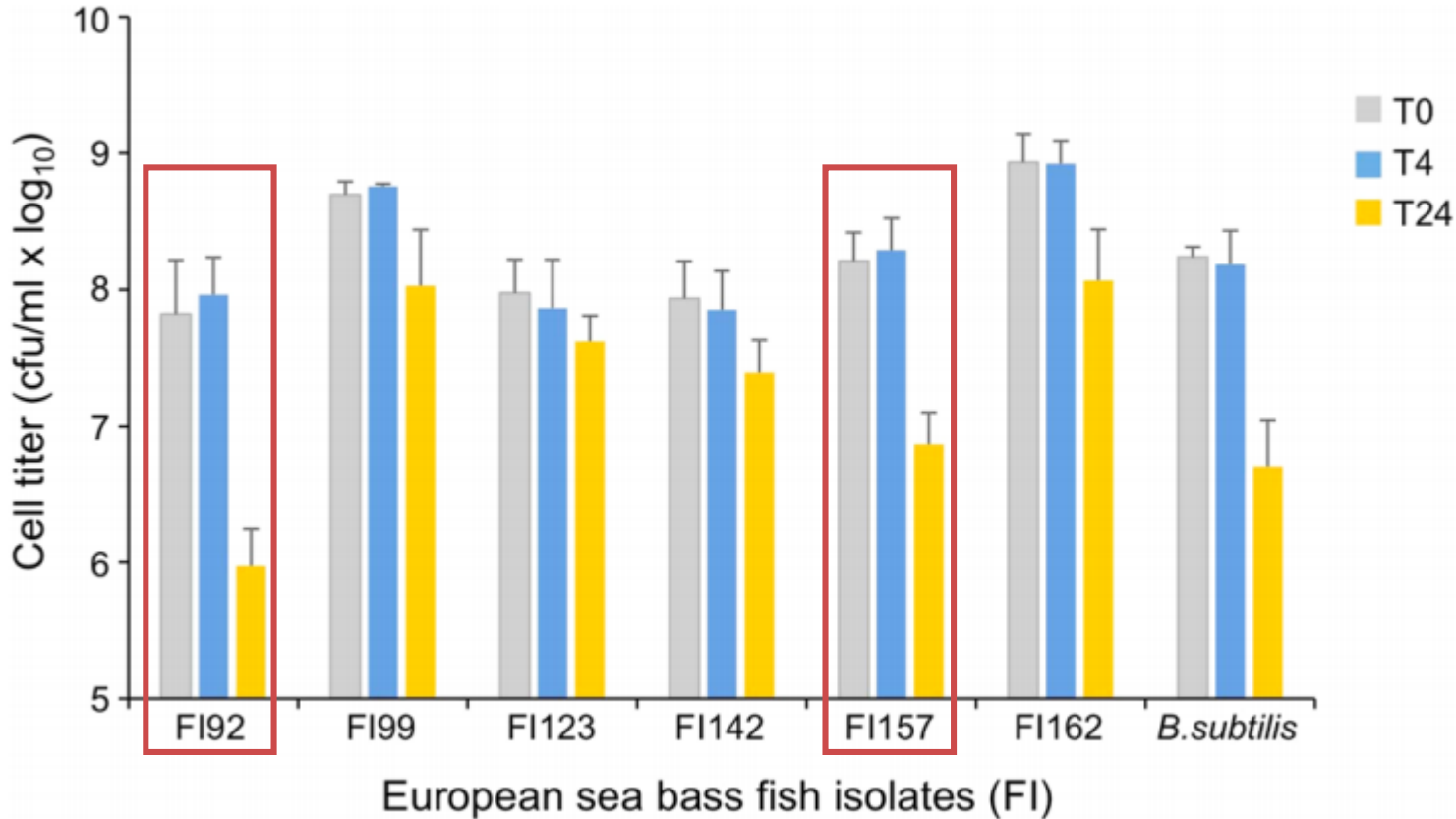
# 孢子形成率



在DSM液体培养基中通过营养耗尽诱导孢子形成，24小时后，分离株FI164，FI187和FI226未达到10<sup>7</sup>/ml。此外，除FI123外，其余六个分离株的孢子形成效率均高于70%，这预示着高成本效益生产的适应性。



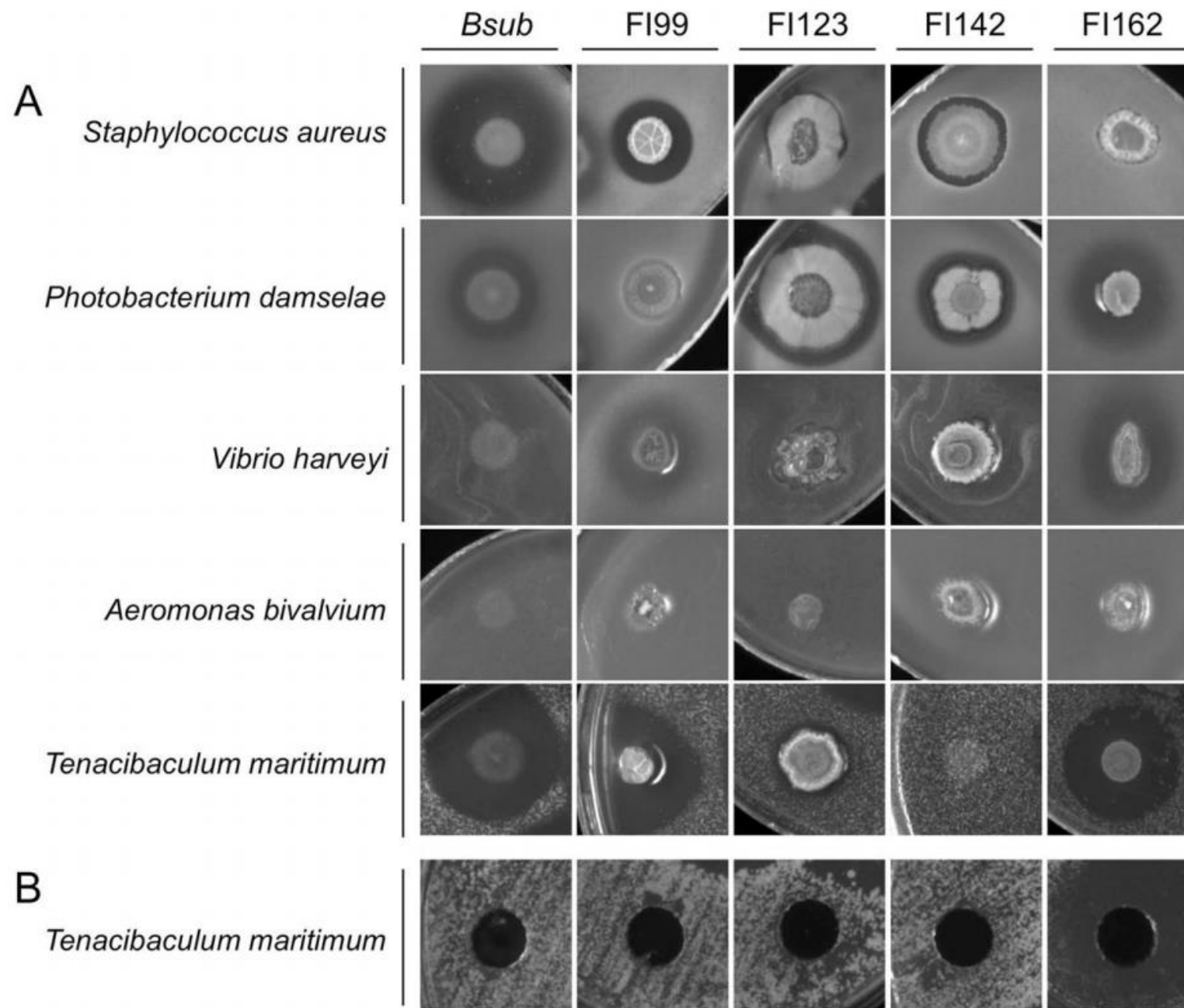
# 肠道环境抗性



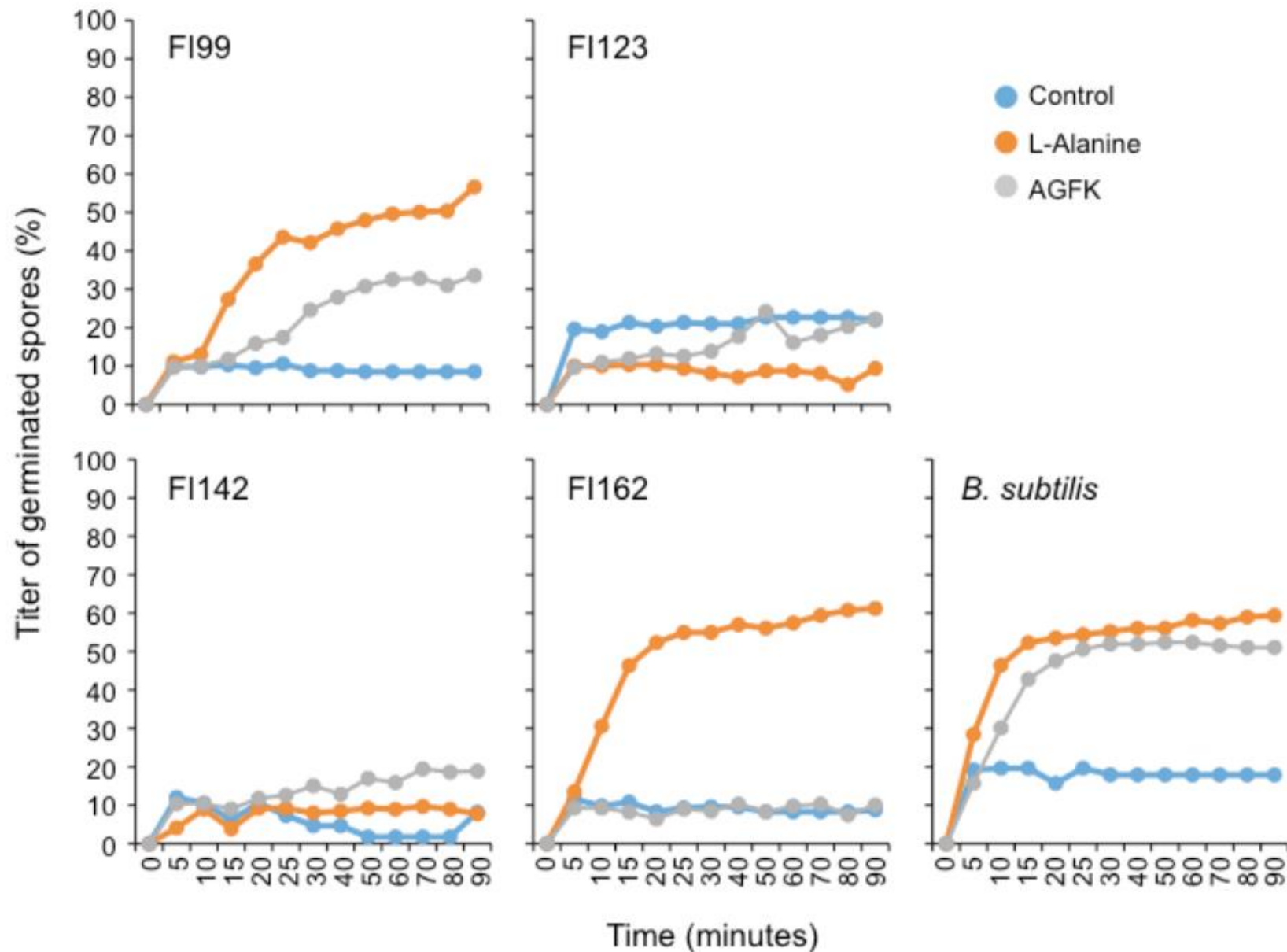
孢子在4小时内进行含有胃蛋白酶的酸化环境中，以模拟胃条件。然后暴露于含有胰酶和胆汁盐的LB培养基中24小时。

# 抑菌活性

所有分离物都显示出一定程度的抗菌活性



# 发芽能力的测试



分离物FI123和FI142不能发芽，FI99和FI162作为最有希望的益生菌菌株。

# 益生菌对鲈鱼生长性能的影响

	Diets				
	CTR—	FI99	FI162	Mix	CTR+
Initial body weight (g)	29.0 ± 0.02	29.0 ± 0.01	29.0 ± 0.03	29.0 ± 0.02	29.0 ± 0.03
Final body weight (g)	74.0 ± 4.8 <sup>a</sup>	83.0 ± 1.6 <sup>ab</sup>	73.7 ± 6.8 <sup>a</sup>	80.0 ± 12.0 <sup>ab</sup>	97.0 ± 2.0 <sup>b</sup>
Weight gain (%IBW <sup>†</sup> )	155.4 ± 16.6 <sup>a</sup>	185.3 ± 5.4 <sup>ab</sup>	160.5 ± 23.2 <sup>a</sup>	176.0 ± 41.3 <sup>ab</sup>	233.8 ± 6.7 <sup>b</sup>
Daily growth index <sup>b</sup>	1.73 ± 0.1	1.98 ± 0.0	1.77 ± 0.2	1.89 ± 0.3	2.34 ± 0.1
Feed intake (g kg ABW <sup>-a</sup> day <sup>-b</sup> )	15.4 ± 1.4	16.7 ± 0.3	15.6 ± 0.2	15.8 ± 1.3	17.5 ± 0.1
Feed efficiency <sup>c</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.84 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>b</sup>
Protein efficiency ratio <sup>d</sup>	1.82 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.84 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.12 <sup>ab</sup>	2.09 ± 0.02 <sup>b</sup>

进行的第二次鱼类生长试验显示补充 $10^9$ 个孢子/g饲料的FI99和FI99 + FI162（混合物），使欧洲鲈鱼幼鱼的体重增加，**饲料效率和蛋白质效率提高**



# 讨论

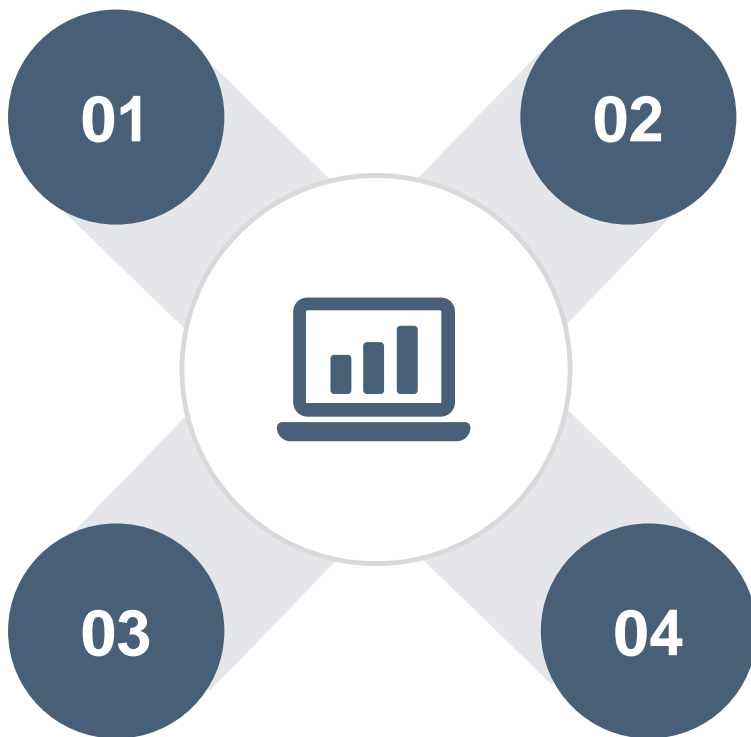
# 讨论

## 通过饮食改变肠道菌群

分离出了具有能利用碳水化合物的产芽孢菌落。

## 益生菌在饲料营养代谢方面的作用

益生菌可以提高饲料利用率，改善饲料，改善鱼类生长性能。



## 孢子形成率是产芽孢益生菌的关键考察条件

孢子作为饲料添加剂更易工业化。在通过胃时，孢子必须发芽，产生新的有益活性物质。

## 益生菌在抗病方面的作用

深刻研究这些基因组将进一步揭示益生菌的作用



收获



通过特定的饮食来诱导肠道微生物，筛选目标菌株

通过添加益生菌，提高肉食性鱼类对植物饲料的利用率，降低了饲料成本和有机污染。通过构建模型来筛选（具有利用糖类，脂类的饲料）的目的菌株，增加糖类，脂类在饲料中的比例，减少动物蛋白的使用。







THANKS

敬请批评指正

AQUACULTURE **2019**  
**REPORT**

