



丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长、形体指标、营养利用和肠道结构功能的影响

朱建国^{1,2,3}, 温彬^{1,2,3,4*}, 成果^{1,2,3}, 高建忠^{1,2,3,4*}, 陈再忠^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

4. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探讨丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长、形体指标、营养利用和肠道结构功能的影响, 在基础饵料中分别添加 0 (对照)、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 cfu/g 丁酸梭菌饲养幼鱼 8 周。结果显示, 与对照组相比, 丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长和形体指标无显著影响。 1×10^5 cfu/g 添加组鱼体粗蛋白含量增加, 对蛋白质的消化率显著提高。丁酸梭菌显著提高了中肠肠道绒毛高度和宽度, 且 1×10^5 cfu/g 添加组肠道酸性黏多糖分泌量显著增加。对于肠道消化酶和抗氧化能力, 1×10^5 cfu/g 添加组胰蛋白酶活性显著提高, 1×10^6 cfu/g 添加组丙二醛含量显著降低。肠道内容物短链脂肪酸分析显示, 1×10^5 cfu/g 添加组的乙酸和丙酸含量显著高于对照组, 且总酸含量在该添加组达到最大, 显著高于其他组。研究表明, 在本试验条件下, 七彩神仙鱼饵料中添加 1×10^5 cfu/g 丁酸梭菌可以改善肠道结构, 提高肠道消化和抗氧化能力, 增加肠道短链脂肪酸的分泌和营养利用率。本研究可为丁酸梭菌在七彩神仙鱼饵料中的科学利用提供参考。

关键词: 七彩神仙鱼; 丁酸梭菌; 生长; 形体指标; 营养利用; 肠道结构功能

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

抗生素滥用易导致耐药性^[1-2], 造成水产养殖巨大的经济损失^[3]。我国已禁止添加抗生素类促生长药物^[4], 因此益生菌成为具有前景的饵料添加剂^[5-7]。丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 作为近几年备受关注的益生菌, 是一种革兰氏阳性厌氧菌, 可以代谢产生消化酶, 短链脂肪酸和氨基酸, 增强机体免疫和抗氧化能力, 调节机体肠道菌群平衡^[8-9]。

七彩神仙鱼 (*Symphysodon haraldi*), 原产于南

美洲亚马逊河流域, 是观赏鱼中的名贵品种^[10]。作为一种肉食性鱼类, 七彩神仙鱼养殖一般以新鲜牛心和虾肉制作成的湿饵料为主, 称为“牛心汉堡”。该饵料为冷冻品且富含高蛋白, 在被七彩神仙鱼咬食过程中易产生残饵, 影响水质, 因此有必要在牛心汉堡中加入饵料添加剂, 进一步保证七彩神仙鱼健康生长。本实验旨在研究丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长、形体指标、营养利用和肠道结构功能的影响, 为丁酸梭菌在七彩神仙鱼饵料

收稿日期: 2021-12-08 修回日期: 2022-03-29

资助项目: 上海扬帆人才计划项目 (19YF1419400); 上海市自然科学基金 (20ZR1423600)

第一作者: 朱建国 (照片), 从事观赏鱼养殖研究, E-mail: zhujguo@126.com

通信作者: 温彬, 从事特色鱼类养殖研究, E-mail: bwen@shou.edu.cn;

高建忠, 从事水产微生物制剂研究与应用, E-mail: jzhgao@shou.edu.cn



中的科学利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饵料

实验所用丁酸梭菌菌种购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。丁酸梭菌活菌菌体制备参考何瑞鹏等^[11]的方法：丁酸梭菌接种于强化培养基

中，37 ℃ 厌氧培养箱活化培养 24 h，显微计数，确定细菌浓度，5000 r/min 离心 10 min，无菌生理盐水梯度稀释制备菌悬液。牛心和去壳虾肉绞碎，添加复合矿物质、复合维生素预混料和 0.05% Y_2O_3 。按一定浓度将丁酸梭菌菌悬液均匀喷洒在基础饵料表面，分别制成 6 种丁酸梭菌添加量的饵料：0 (对照)、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 cfu/g (表 1)。

表 1 实验饵料组成及营养水平

Tab. 1 Composition and nutrient levels of experimental diets

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0 cfu/g	1×10^4 cfu/g	1×10^5 cfu/g	1×10^6 cfu/g	1×10^7 cfu/g	1×10^8 cfu/g
牛心 beef heart	79.16	79.16	79.16	79.16	79.16	79.16
虾肉 shrimp meat	19.79	19.79	19.79	19.79	19.79	19.79
维生素预混料 vitamin premix ^a	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 mineral premix ^b	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氧化钇 Y_2O_3	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
合计 total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 nutrient levels						
水分 moisture	77.80	77.61	77.53	77.82	77.75	77.62
粗蛋白 crude protein ^c	85.40	85.50	85.55	85.60	85.40	85.50
粗脂肪 crude lipid ^c	8.40	8.45	8.40	8.42	8.44	8.42
粗灰分 crude ash ^c	4.30	4.40	4.35	4.38	4.40	4.42

注：1) 维生素预混料 (mg或IU/kg饵料)，维生素A 750 IU，维生素D₃ 1 450 IU，维生素E 7.75 IU，维生素B₁ 2.5 mg，维生素B₂ 2.5 mg，维生素B₆ 2.5 mg，维生素K₃ 1 mg，烟酸 7.5 mg，泛酸钙 7.5 mg，叶酸0.4 mg，叶酸0.4 mg。2) 矿物质预混料 (mg/kg饵料)，铜4 mg，铁123.5 mg，锰16.5 mg，锌24.5 mg，硒0.08 mg，碘3.25 mg，钴 0.325 mg。

Notes: 1) vitamin premix (mg or IU/kg diet), VA 750 IU, VD₃ 1 450 IU, VE 7.75 IU, VB₁ 2.5 mg, VB₂ 2.5 mg, VB₆ 2.5 mg, VK₃ 1 mg, nicotinic 7.5 mg, calcium pantothenate 7.5 mg, folic acid 0.4 mg. 2) mineral premix (mg/kg diet), Cu 4 mg, Fe 123.5 mg, Mn 16.5 mg, Zn 24.5 mg, Se 0.08 mg, I 3.25 mg, Co 0.325 mg.

1.2 实验用鱼及饲养管理

七彩神仙鱼由上海海洋大学观赏水族实验基地提供。选取 180 尾体型相近 [初始体重 (2.03±0.40) g，体长 (3.39±0.26) cm，体高 (2.90±0.12) cm] 个体，随机分至 18 个养殖缸 (35 cm × 45 cm × 35 cm)，分为 6 个试验组，每组 3 个重复，每缸 10 尾鱼。实验过程中，缸内保持 24 h 曝气，溶解氧 > 5 mg/L，水温 (29.0±0.5) ℃，pH 7.8±0.3。每天按体重 4%~5% 进行投喂 (8:00、13:00 和 18:00)，并根据鱼体摄食情况进行调整，投喂 1 h 后收集粪便和残饵保存于 -20 ℃。每天换水 1/3，实验周期为 8 周。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利伦理规范。

1.3 样品采集及测定分析

营养物质消化率 在饲养实验最后 2 周，每天于投喂 1 h 后收集粪便，保存于 -20 ℃。饵料

和粪便中 Y_2O_3 含量采用等离子体发射光谱法 (ICP) 测定。按下列公式计算：

干物质消化率 (%) = (1 - 饵料中 Y_2O_3 含量 / 粪便中 Y_2O_3 含量) × 100%

营养物质消化率 (%) = [1 - (粪便中营养物质含量 / 饵料中营养物质含量) × (饵料中 Y_2O_3 含量 / 粪便中 Y_2O_3 含量)] × 100%

生长和形体指标 饲养实验结束后，禁食 24 h，用 MS-222 (100 mg/L) 麻醉称重计数，计算增重率、特定生长率、体长增长率、体高增长率、体长/体高、肥满度、饵料系数、成活率。按下列公式计算：

增重率 (WGR, %) = (终末体重 - 初始体重) / 初始体重 × 100%

特定生长率 (SGR, %/d) = (ln 终末体重 - ln 初始体重) / 饲喂天数 × 100%

体长增长率 (LGR, %) = (终末体长 - 初始体长) /

初始体长×100%

体高增长率 (HGR, %)=(终末体高-初始体高)/
初始体高×100%

体长/体高 (L/H)=终末体长/终末体高

肥满度 (CF, g/cm³)=终末体重/终末体长³×100

饵料系数 (FCR)=饵料投喂量/(终末体重-初始
体重)

成活率 (SR, %)=终末鱼总数/初始鱼总
数×100%

常规营养成分含量 每个重复随机取 3 尾
鱼, 采用 AOAC 标准方法对全鱼及饵料常规营养
成分进行测定。水分采用 105 °C 干燥法测定; 粗
蛋白含量采用凯氏定氮法测定; 粗脂肪含量采用
氯仿-甲醇提取法测定; 粗灰分含量采用马弗炉灰
分法测定。按下列公式计算:

蛋白质沉积率 (PR, %)=(终末体重×终末全鱼
蛋白质含量-初始体重×初始全鱼蛋白质含量)/蛋
白质摄入量×100%

脂肪沉积率 (LR, %)=(终末体重×终末全鱼脂
肪含量-初始体重×初始全鱼脂肪含量)/脂肪摄入
量×100%

肠道组织结构与酶活性 每个重复随机
取 3 尾鱼, 剪取 0.5 cm 中肠肠道, 放入已标记的
装有 4% 多聚甲醛溶液的离心管中, 室温下保存;
剩余肠道组织装入 5 mL 离心管, 液氮速冻, 保存
于-80 °C, 用于酶活性检测。

石蜡切片制备与观察 中肠肠道固定 24
h 后包埋切片, 分别进行 H.E 染色 (苏木精-伊红)
和 AB-PAS 染色 (阿利新蓝-GDS-雪弗), 采用扫描
仪 (Pannoramic MIDI, 3D HISTECH) 进行全方位

扫描。

消化酶及抗氧化相关酶活性测定 淀粉
酶 (AMS)、脂肪酶 (LPS)、胰蛋白酶 (TRY)、丙二
醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶
(SOD) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 指标的测定采用
南京建成生物工程研究所试剂盒。

肠道内容物短链脂肪酸 (short-chain fatty
acids, SCFAs) 含量 每个重复随机取 3 尾鱼,
将肠道内容物挤入 1.5 mL 灭菌离心管中振荡混匀,
采用气相色谱法 (Agilent 7890A/5975C 气-质联用
仪) 测定乙酸, 丙酸, 丁酸及总酸含量。

1.4 数据分析

实验数据用平均值±标准差 (mean±SD) 表示,
采用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析
(One-Way ANOVA) 及 Tukey 氏多重比较, $P<0.05$
为差异显著。

2 结果

2.1 生长和形体指标

与对照组相比, 丁酸梭菌添加组七彩神仙鱼
WGR、SGR 和 FCR 差异不显著 ($P>0.05$), 但
 1×10^5 cfu/g 添加组 WGR 和 SGR 最高分别提高
11.83%、8.61%, FCR 降低 19.65%。添加组 LGR、
HGR 和 L/H 间差异不显著 ($P>0.05$)。养殖结束后
各组存活率均为 100% (表 2)。

2.2 体组成与营养利用

与对照组相比, 1×10^5 和 1×10^7 cfu/g 丁酸梭
菌添加组鱼体粗蛋白含量显著提高 ($P<0.05$)。除

表 2 丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长和形体指标的影响

Tab. 2 Effects of *C. butyricum* on growth and body index of *S. haraldi*

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0	1×10^4 cfu/g	1×10^5 cfu/g	1×10^6 cfu/g	1×10^7 cfu/g	1×10^8 cfu/g
增重率/% WGR	273.37±60.49 ^a	275.69±65.15 ^a	305.72±56.45 ^a	297.94±62.81 ^a	304.51±64.23 ^a	296.12±70.39 ^a
特定增长率/(%/d) SGR	2.09±0.67 ^a	2.13±0.50 ^a	2.27±0.51 ^a	2.23±0.48 ^a	2.24±0.56 ^a	2.19±0.61 ^a
体长增长率/% LGR	54.39±17.85 ^a	49.37±20.29 ^a	59.16±15.84 ^a	56.42±15.17 ^a	59.17±16.94 ^a	58.03±18.87 ^a
体高增长率/% HGB	36.74±14.95 ^a	32.47±14.16 ^a	39.21±14.13 ^a	36.82±17.26 ^a	40.80±17.51 ^a	38.38±19.07 ^a
体长/体高 L/H	1.34±0.15 ^a	1.33±0.14 ^a	1.35±0.14 ^a	1.35±0.16 ^a	1.34±0.17 ^a	1.36±0.19 ^a
肥满度/(g/cm ³) CF	5.09±0.61 ^a	5.86±1.27 ^a	5.14±0.61 ^a	5.28±0.51 ^a	5.07±0.58 ^a	5.04±0.50 ^a
饵料系数 FCR	3.46±0.56 ^a	3.14±0.72 ^a	2.78±0.33 ^a	3.21±0.40 ^a	2.92±0.44 ^a	3.79±0.40 ^a
成活率/% SR	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

注: 同行相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 同行不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Notes: In the same row, values with same letters mean no significant difference ($P>0.05$), values with different letters mean significant differences ($P<0.05$), the same below.

1×10⁵ cfu/g 添加组蛋白质消化率显著提高 ($P < 0.05$), 其他添加组营养沉积率和消化率差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 丁酸梭菌对七彩神仙鱼体组成和营养利用的影响

Tab. 3 Effects of *C. butyricum* on body composition and nutrient utilization of *S. haraldi* %

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0 cfu/g	1×10 ⁴ cfu/g	1×10 ⁵ cfu/g	1×10 ⁶ cfu/g	1×10 ⁷ cfu/g	1×10 ⁸ cfu/g
水分 moisture	76.23±0.23 ^a	76.37±0.34 ^a	75.62±0.24 ^a	76.33±0.32 ^a	76.55±0.14 ^a	74.94±0.41 ^a
粗蛋白 crude protein	14.28±0.05 ^c	14.60±0.20 ^{bc}	15.84±0.05 ^a	14.74±0.17 ^{bc}	15.14±0.56 ^{ab}	14.43±0.12 ^{bc}
粗脂肪 crude lipid	3.12±0.12 ^a	3.14±0.22 ^a	3.12±0.14 ^a	3.13±0.47 ^a	3.14±0.14 ^a	3.13±0.12 ^a
粗灰分 crude ash	3.45±0.13 ^a	3.44±0.14 ^a	3.45±0.22 ^a	3.44±0.16 ^a	3.45±0.23 ^a	3.45±0.38 ^a
蛋白质沉积率 PR	23.71±1.92 ^a	25.56±1.50 ^a	28.22±0.91 ^a	25.03±2.93 ^a	26.41±1.70 ^a	24.11±3.40 ^a
脂肪沉积率 LR	25.19±2.60 ^a	27.31±2.01 ^a	27.17±3.66 ^a	25.60±1.41 ^a	26.32±0.97 ^a	25.72±2.27 ^a
蛋白质消化率 ADC of CP	70.62±1.44 ^b	73.25±2.57 ^{ab}	75.53±1.42 ^a	71.31±0.78 ^{ab}	71.63±1.81 ^{ab}	70.30±1.73 ^b
脂肪消化率 ADC of CL	64.21±0.14 ^a	64.85±1.12 ^a	65.12±0.12 ^a	65.10±1.20 ^a	64.42±1.32 ^a	64.33±1.45 ^a
干物质消化率 ADC of DM	78.12±2.30 ^a	78.30±1.01 ^a	80.31±2.03 ^a	78.14±0.41 ^a	79.71±2.10 ^a	78.20±0.92 ^a

注: ADC.表观消化率; CL.粗脂肪; CP.粗蛋白; DM.干物质; PR.蛋白质沉积率; LR.脂肪沉积率。
Notes: ADC. apparent digestibility coefficient; CL. crude lipid; CP. crude protein; DM. dry matter; PR. protein retention; LR. lipid retention.

2.3 肠道组织结构

与对照组相比, 1×10⁵ cfu/g 丁酸梭菌添加组七彩神仙鱼中肠绒毛排列整齐且较紧密 (图 1)。各添加组中肠绒毛高度均显著提高 ($P < 0.05$), 1×10⁵ cfu/g 添加组绒毛宽度显著高于其他添加组 ($P < 0.05$), 添加组肠道肌层厚度差异不显著 ($P > 0.05$) (表 4)。AB-PAS 染色结果显示, 1×10⁵ cfu/g 添加组肠道内蓝紫色颗粒密度分布显著高于对照组且

颗粒多分布在肠道绒毛边缘 (图 2)。

2.4 肠道消化酶和抗氧化能力

与对照组相比, 1×10⁵ cfu/g 丁酸梭菌添加组七彩神仙鱼肠道胰蛋白酶活性显著提高 ($P < 0.05$), 各组间 AMS、LPS 活性差异不显著 ($P > 0.05$)。除 1×10⁶ cfu/g 添加组肠道 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 各组间 CAT、SOD 活性和 GSH 水平差异不显著 ($P > 0.05$) (表 5)。

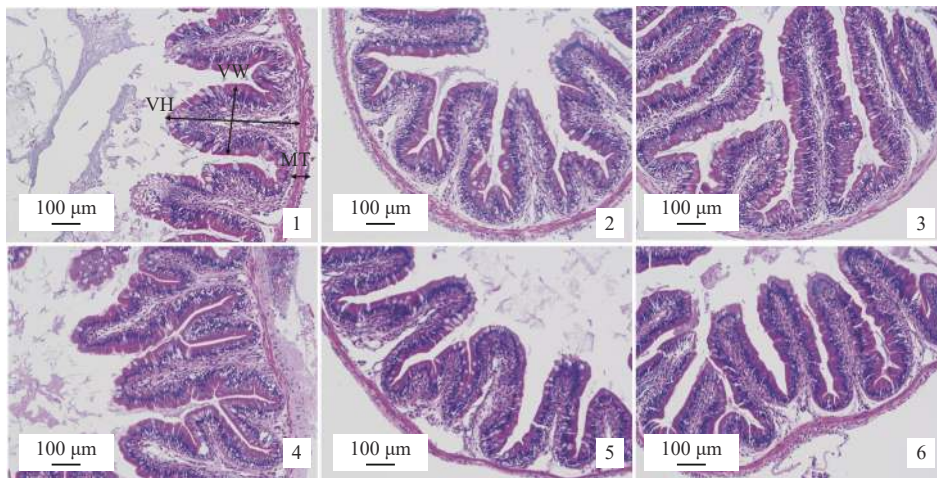


图 1 不同处理组中肠组织切片 (H.E 染色) 观察结果

1-6 分别表示七彩神仙鱼饲喂 0 (对照)、1×10⁴、1×10⁵、1×10⁶、1×10⁷、1×10⁸ cfu/g 丁酸梭菌后中肠形态变化, 下同。VH.绒毛高度, VW.绒毛宽度, MT.肌层厚度。200×。

Fig. 1 The observation results of midgut tissue sections (H.E staining) in different treatment groups

Histological examination in 1-6 respectively shows the morphological changes of midgut after feeding 0 (control), 1×10⁴, 1×10⁵, 1×10⁶, 1×10⁷, 1×10⁸ cfu/g *C. butyricum* to *S. haraldi*, the same below. VH. villus height, VW. villus width, MT. muscular thickness. The magnification is 200 ×.

表 4 丁酸梭菌对七彩神仙鱼肠道结构的影响

Tab. 4 Effects of *C. butyricum* on intestinal structure of *S. haraldi* μm

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0 cfu/g	1×10 ⁴ cfu/g	1×10 ⁵ cfu/g	1×10 ⁶ cfu/g	1×10 ⁷ cfu/g	1×10 ⁸ cfu/g
绒毛高度 VH	228.87±11.49 ^c	283.50±6.18 ^b	366.43±18.93 ^a	298.63±3.10 ^b	282.50±2.00 ^b	282.53±2.08 ^b
绒毛宽度 VW	127.77±6.53 ^b	127.97±3.69 ^b	144.73±5.36 ^a	132.67±2.41 ^{ab}	126.83±3.59 ^b	125.33±3.94 ^b
肌层厚度 MT	24.80±3.08 ^a	29.10±4.18 ^a	28.57±1.60 ^a	27.77±1.25 ^a	23.90±6.10 ^a	26.53±1.86 ^a

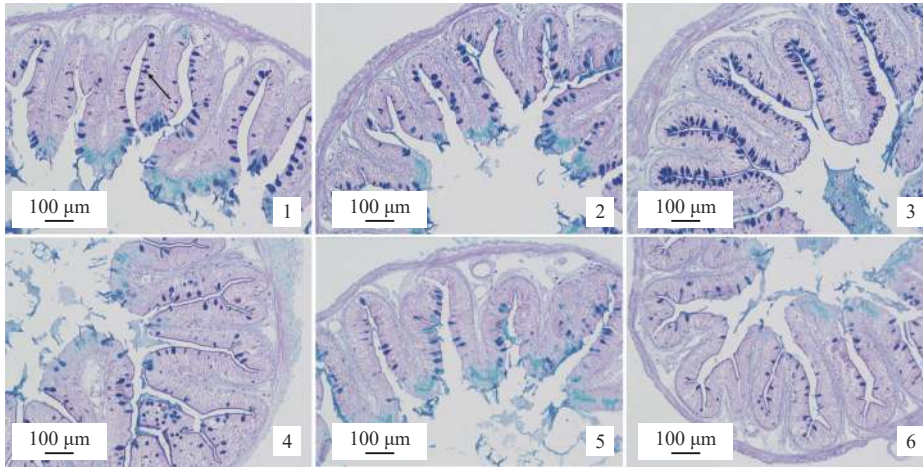


图 2 不同处理组中肠组织切片 (AB-PAS 染色) 观察结果

黑色箭头表示黏多糖, 200×。

Fig. 2 The observation results of midgut tissue sections (AB-PAS staining) in different treatment groups

Black arrows indicate mucopolysaccharides. The magnification is 200 ×.

表 5 丁酸梭菌对七彩神仙鱼肠道功能的影响

Tab. 5 Effects of *C. butyricum* on intestinal function of *S. haraldi*

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0 cfu/g	1×10 ⁴ cfu/g	1×10 ⁵ cfu/g	1×10 ⁶ cfu/g	1×10 ⁷ cfu/g	1×10 ⁸ cfu/g
淀粉酶/(U/mg prot) AMS	0.90±0.03 ^a	0.97±0.22 ^a	1.12±0.12 ^a	1.18±0.09 ^a	0.98±0.12 ^a	0.98±0.22 ^a
脂肪酶/(U/g prot) LPS	33.75±2.54 ^a	33.93±4.31 ^a	36.98±10.68 ^a	33.79±4.82 ^a	34.24±2.51 ^a	33.76±6.07 ^a
胰蛋白酶/(U/mg prot) TRY	13.15±0.14 ^b	14.58±1.23 ^b	19.88±0.36 ^a	15.78±2.11 ^b	15.99±1.47 ^b	14.24±1.02 ^b
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	8.65±2.56 ^a	9.54±0.91 ^a	9.57±0.20 ^a	9.29±4.93 ^a	8.92±1.38 ^a	8.61±0.64 ^a
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	36.57±1.13 ^a	36.78±6.53 ^a	38.61±1.73 ^a	41.13±8.55 ^a	34.12±5.07 ^a	35.33±1.83 ^a
还原型谷胱甘肽/(μmol/g prot) GSH	29.61±3.84 ^a	29.81±9.56 ^a	31.39±2.94 ^a	34.37±9.60 ^a	32.03±3.94 ^a	30.76±3.66 ^a
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	3.40±0.71 ^a	3.08±0.95 ^a	3.14±0.35 ^a	1.49±0.34 ^b	2.35±0.24 ^{ab}	2.06±1.13 ^{ab}

2.5 肠道内容物短链脂肪酸含量

与对照组相比, 1×10⁵ cfu/g 丁酸梭菌添加组七彩神仙鱼肠道内容物中乙酸和丙酸含量显著提高 ($P<0.05$), 1×10⁴ cfu/g、1×10⁵ cfu/g 添加组总酸含量显著提高 ($P<0.05$) (表 6)。

3 讨论

3.1 丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长和形体指标的影响

研究发现, 丁酸梭菌影响鱼类生长健康不仅与添加量有关, 还与不同鱼类耐受程度有关。樊

表 6 丁酸梭菌对七彩神仙鱼肠道内容物短链脂肪酸的影响

Tab. 6 Effects of *C. butyricum* on SCFAs in intestinal contents of *S. haraldi*

μg/g

项目 items	丁酸梭菌水平 <i>C. butyricum</i> levels					
	0 cfu/g	1×10 ⁴ cfu/g	1×10 ⁵ cfu/g	1×10 ⁶ cfu/g	1×10 ⁷ cfu/g	1×10 ⁸ cfu/g
乙酸 acetic acid	1703.19±18.78 ^{bc}	1974.13±111.24 ^{ab}	2141.11±43.82 ^a	1698.90±122.33 ^c	1796.23±129.33 ^{bc}	1755.74±112.40 ^{bc}
丙酸 propionic acid	165.88±47.15 ^b	296.84±53.76 ^{ab}	395.67±42.10 ^a	167.32±76.09 ^b	288.11±17.16 ^{ab}	234.01±88.75 ^b
丁酸 butyric acid	28.87±3.49 ^a	40.29±19.61 ^a	48.27±3.57 ^a	37.05±5.28 ^a	48.23±4.78 ^a	37.32±10.46 ^a
总酸 total SCFAs	2016.86±58.35 ^c	2477.71±62.60 ^{ab}	2818.40.73±161.93 ^a	2037.06±186.14 ^c	2337.61±177.88 ^{bc}	2281.34±174.41 ^{bc}

英等^[12]研究发现, 饵料中添加 7.35×10^6 cfu/g 丁酸梭菌可显著提高虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 特定生长率, 降低饵料系数。舒琥等^[13]研究也发现, 添加 3×10^{10} cfu/g 的丁酸梭菌菌粉可提高宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 增重率。但朱振祥^[14]却发现, 添加 1×10^7 cfu/g 丁酸梭菌, 鲤 (*Cyprinus carpio*) 增重率、特定生长率均无显著变化。本研究发现, 虽然丁酸梭菌对七彩神仙鱼的生长无显著影响, 但添加组各项生长指标均有所提高。形体指标是评价七彩神仙鱼观赏品质的重要标准。在本研究中, 丁酸梭菌对七彩神仙鱼体长增长率、体高增长率以及体长与体高之比均无显著影响, 说明丁酸梭菌对七彩神仙鱼形体影响不显著。丁酸梭菌提高生长指标的机制可能是通过营造健康的肠道微生态环境, 促进营养物质消化吸收^[15-16]。因此实验对七彩神仙鱼肠道结构、相关酶活性和短链脂肪酸含量进行了深入研究。

3.2 丁酸梭菌对七彩神仙鱼体组成和营养利用的影响

本研究发现, 1×10^5 cfu/g 与 1×10^7 cfu/g 添加组鱼体粗蛋白含量显著提高。Duan 等^[17-18]研究同样指出, 1×10^9 cfu/g 丁酸梭菌可提高凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 粗蛋白含量, 这表明丁酸梭菌可以改善机体营养成分含量。Poolsawat 等^[19]研究发现, 丁酸梭菌可显著提高尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 蛋白质和脂肪消化率, 本研究也发现, 添加组蛋白质消化率显著提高。丁酸梭菌对营养利用率的积极影响可能与其代谢产物有关, 乙酸作为肠道上皮细胞生长的基本能量, 有助于增强肠道黏膜屏障功能, 促进营养吸收^[7,20]。此外, 丁酸梭菌还可以通过平衡肠道菌群结构, 提高营养利用^[15]; 同时短链脂肪酸还能提高消化酶活性如胰蛋白酶活性, 增强蛋白质消化率, 提高鱼体粗

蛋白含量^[18-19]。

3.3 丁酸梭菌对七彩神仙鱼肠道结构功能的影响

肠道上皮作为一种物理屏障, 在营养吸收方面起着有益的作用。潘晓东^[21]发现, 丁酸梭菌可显著提高鳊 (*Miichthys miuuy*) 肠道绒毛高度和宽度。Meng 等^[22]发现, 丁酸梭菌可提高鲤肠道绒毛高度, 但肌层厚度在各组间差异不显著, 本研究得出相似结果。饵料中添加益生菌改善肠道形态可能是通过与致病微生物竞争营养物质或黏附位点, 从而减少致病微生物的繁殖^[23]。研究证明, 丁酸梭菌具有良好的黏附作用, 且黏附后对机体细胞损伤不明显, 可减少肠道内大肠杆菌的数量^[19,21]。

研究表明, 益生菌可以调节机体肠道黏膜免疫, 这主要得力于益生菌刺激肠道分泌的黏多糖^[24]。肠道杯状细胞能够将黏多糖分泌到肠腔中形成黏液层, 这些黏液层可以有效阻止有害物质进入肠道深层, 形成抵抗病原菌入侵的第一道防线^[25]。也有研究发现, 酸性黏多糖还具有协助肠道益生菌定殖等功能^[26-28]。邓振旭等^[29]指出, AB-PAS 染色较 AB 染色和 PAS 染色可以更好地反映出细胞中的中性黏多糖和酸性黏多糖的具体分布情况。鲤肠道 AB-PAS 染色发现, 丁酸梭菌处理组肠黏液中代表酸性黏多糖的蓝紫色颗粒明显增多^[22]。本研究同样发现, 1×10^5 cfu/g 添加组肠道内蓝紫色颗粒显著增多, 表明丁酸梭菌可显著促进七彩神仙鱼肠道杯状细胞分泌酸性黏多糖, 增强肠道黏膜免疫能力。

范晨薇^[30]、何瑞鹏等^[11]发现, 丁酸梭菌能显著提高试验动物肠道中胰蛋白酶和脂肪酶活性。本研究同样发现, 1×10^5 cfu/g 添加组胰蛋白酶活性显著提高, 淀粉酶、脂肪酶活性较对照组变化不显著但仍有提高, 以上结果说明丁酸梭菌可以提高七彩神仙鱼肠道消化酶活性。这可能因为丁

酸梭菌在肠道内产生短链脂肪酸的含量会降低肠道 pH 值^[14], 稍低的 pH 值可能会提高消化酶活性, 从而提高对营养物质的消化吸收能力; 也可能因为丁酸梭菌定殖后, 代谢产生的消化酶如纤维素酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等, 导致机体肠道消化酶活性提高^[31-32]。

本研究发现, 添加适量的丁酸梭菌可提高肠道还原型谷胱甘肽、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性。饵料中添加 1×10^7 cfu/g 丁酸梭菌可提高鲤肠道过氧化氢酶活性^[17]。兰菲菲^[33]研究也指出, 鳊肠道还原型谷胱甘肽和超氧化物歧化酶活性在 1×10^8 cfu/g 丁酸梭菌影响下显著提高。丙二醛是反映氧化应激的典型指标, 在日本囊对虾^[18]和尼罗罗非鱼^[19]的饵料中添加丁酸梭菌可以降低肠道丙二醛含量, 这与本研究结果一致。丁酸梭菌的代谢产物(如消化酶类、丁酸和氢气)抑制了肠道病原菌的繁殖或刺激了免疫系统, 从而降低炎症反应^[34], 这可能是肠道抗氧化能力提高的原因之一。丁酸梭菌还可以生成 NADH, 清除活性氧, 提高抗氧化能力^[35]。

短链脂肪酸在动物消化道脂质代谢和维持动物肠道健康方面发挥着重要作用^[36-37]。研究表明, 肠道内的短链脂肪酸主要来源于肠道微生物群的代谢, 可穿透细菌细胞壁, 将质子(H)释放到中性细胞并降低 pH 值^[38], 而病原菌则将质子外排, 营造极端酸性环境, 导致细胞生长速率降低甚至死亡^[39-41]。Chen 等^[42]和 Han^[43]等研究发现, 丁酸梭菌可在动物肠道中产生高水平的短链脂肪酸, 在治疗肠道炎症和促进肠道吸收中发挥关键作用。潘晓东^[21]和宋增福^[44]均发现, 丁酸梭菌可以显著提高鳊肠道中后段乙酸含量。本研究结果同样显示, 1×10^5 cfu/g 添加组肠道内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量均高于对照组。这可能与短链脂肪酸联系紧密的其他细菌丰度增加有关, 例如属于厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的细菌^[17, 30], 后续可以通过肠道菌群测定试验来对七彩神仙鱼肠道微生物组成进一步确认。

4 结论

添加适量的丁酸梭菌对七彩神仙鱼生长和形体指标无显著影响, 但可显著提高蛋白质消化率, 增加鱼体粗蛋白含量。添加适量的丁酸梭菌可显著提高七彩神仙鱼肠道绒毛高度和宽度, 提高胰蛋白酶活性, 降低丙二醛含量, 促进肠道酸性黏

多糖和短链脂肪酸的分泌。本实验条件下, 七彩神仙鱼饵料中添加 1×10^5 cfu/g 丁酸梭菌效果最好。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈愿, 张永安, 周洋. 噬菌体在水产养殖业中的研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(9): 1605-1615.
Chen Y, Zhang Y A, Zhou Y. Research progress of bacteriophage in aquaculture[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(9): 1605-1615 (in Chinese).
- [2] Zhang G L, Zhang Y, Wang H, et al. Comparative genomic analysis of five high drug-resistance *Aeromonas hydrophila* strains induced by doxycycline in laboratory and nine reference strains in Genbank[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(7): 2553-2559.
- [3] CaBello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [4] Lyu J, Yang L S, Zhang L, et al. Antibiotics in soil and water in China—a systematic review and source analysis[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266: 115147.
- [5] Hoseinifar S H, Sun Y Z, Wang A R, et al. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2429.
- [6] Wang A R, Ran C, Wang Y B, et al. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 734-755.
- [7] Meng X L, Hu W P, Wu S K, et al. Chinese yam peel enhances the immunity of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by improving the gut defence barrier and modulating the intestinal microflora[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 95: 528-537.
- [8] Kanai T, Mikami Y, Hayashi A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2015, 50(9): 928-939.
- [9] Murayama T I, Mita N, Tanaka M, et al. Effects of orally administered *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 on mucosal immunity in mice[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 48(3-4): 333-342.

- [10] 冯晓飒, 温彬, 刘君恒, 等. 微塑料与多环芳烃菲复合胁迫对七彩神仙鱼稳定同位素和生态化学计量学特征的影响[J]. 水产学报, 2020, 44(10): 1742-1751.
Feng X S, Wen B, Liu J H, *et al.* Effects of microplastics and phenanthrene on the stable isotope and ecological stoichiometry of juvenile discus fish (*Symphysodon haraldi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(10): 1742-1751 (in Chinese).
- [11] 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:自然科学版, 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]. Journal of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2017, 47(11): 15-23 (in Chinese).
- [12] 樊英, 叶海斌, 王晓璐, 等. 丁酸梭菌和凝结芽孢杆菌对虹鳟生长性能、肝功能及肠道菌群的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(2): 198-203.
Fan Y, Ye H B, Wang X L, *et al.* Effects of *Clostridium butyricum* and *Bacillus coagulans* on growth performance, hepatic function and intestinal microbiota in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2019, 34(2): 198-203 (in Chinese).
- [13] 舒璇, 郭静文, 詹博锐, 等. 饲料中添加酪酸菌对宝石鲈生长性能的影响[J]. 水产养殖, 2019, 40(1): 39-43.
Shu H, Guo J W, Zhan B R, *et al.* Effects of feeding *Clostridium butyricum* on the growth properties in *Scortum barcoo*[J]. Journal of Aquaculture, 2019, 40(1): 39-43 (in Chinese).
- [14] 朱振祥. 丁酸梭菌对鲤生长、免疫及肠道微生态的影响[D]. 新乡: 河南师范大学, 2019.
Zhu Z X. Effects of *Clostridium Butyricum* on growth, immunity and intestinal microecology of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2019 (in Chinese).
- [15] Nakanishi S, Kataoka K, Kuwahara T, *et al.* Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon[J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47(12): 951-958.
- [16] Zhao X, Guo Y M, Guo S S, *et al.* Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6477-6488.
- [17] Duan Y F, Zhang Y, Dong H B, *et al.* Effect of dietary *Clostridium butyricum* on growth, intestine health status and resistance to ammonia stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 65: 25-33.
- [18] Duan Y F, Dong H B, Wang Y, *et al.* Effects of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on intestine digestive and metabolic capacities, SCFA content and body composition in *Marsupenaeus japonicus*[J]. Journal of Ocean University of China, 2018, 17(3): 690-696.
- [19] Poolsawat L, Li X Q, He M, *et al.* *Clostridium butyricum* as probiotic for promoting growth performance, feed utilization, gut health and microbiota community of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2020, 26(3): 657-670.
- [20] Junghare M, Subudhi S, Lal B. Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: optimization of process parameters[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(4): 3160-3168.
- [21] 潘晓东. 丁酸梭菌体外粘附抗菌特性及对鮰鱼肠道生理的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
Pan X D. Research on adherence and anti-bacteria property of *Clostridium butyricum* and its effect on *Miichthys miiuy* intestinal physiology[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006 (in Chinese).
- [22] Meng X L, Wu S K, Hu W P, *et al.* *Clostridium butyricum* improves immune responses and remodels the intestinal microbiota of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735753.
- [23] Yan F, Polk D B. Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2010, 26(2): 95-101.
- [24] Standen B T, Peggs D L, Rawling M D, *et al.* Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Shellfish Immunology, 2016, 49: 427-435.
- [25] 张曼, 霍军, 王军, 等. 霉菌毒素对肠道黏膜屏障功能影响的研究进展[J]. *中国饲料*, 2021(21): 1-4.
Zhang M, Huo J, Wang J, *et al.* Progress on the effect of mycotoxins on intestinal mucosal barrier function[J]. *China Feed*, 2021(21): 1-4 (in Chinese).
- [26] 黄则华, 曾悦, 黄春兰. 肠道菌群对黏蛋白2的影响及其作用机制[J]. *胃肠病学*, 2019, 24(2): 111-114.
Huang Z H, Zeng Y, Huang C L. Effect and mechanism of intestinal flora on Mucin 2[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2019, 24(2): 111-114 (in Chinese).
- [27] Atuma C, Strugala V, Allen A, *et al.* The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*[J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001, 280(5): G922-G929.
- [28] Bergstrom K S B, Guttman J A, Rumi M, *et al.* Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen[J]. *Infection & Immunity*, 2008, 76(2): 796-811.
- [29] 邓振旭, 楚德昌. 巴西彩龟与中华鳖消化道粘液细胞组织化学染色[J]. *四川动物*, 2007, 26(2): 267-269.
Deng Z X, Chu D C. Histochemistry study on mucous cells in digestive tract of *Trachemys scripta*, *Trionyx sinensis*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2007, 26(2): 267-269 (in Chinese).
- [30] 范晨薇. 丁酸梭菌对克氏原螯虾肠道健康的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Fan C W. Effects of *Clostridium butyricum* on intestinal health of *Procambarus clarkia*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [31] Araki Y, Andoh A, Takizawa J, *et al.* The long-term oral administration of a product derived from a probiotic, *Clostridium butyricum* induced no pathological effects in rats[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2003, 12(4): 571-575.
- [32] 姜芳芳, 李圣杰, 丁轲, 等. 丁酸梭菌C. L24蛋白酶产酶条件的优化[J]. *家畜生态学报*, 2016, 37(1): 63-67.
Jiang F F, Li S J, Ding K, *et al.* Optimization of proteinase producing conditions of a beneficial *Clostridium butyricum*[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2016, 37(1): 63-67 (in Chinese).
- [33] 兰菲菲. 饵料中添加丁酸梭菌对鳊鲈生长与健康的促进作用 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
Lan F F. Effect of *Clostridium butyrate* added to feed on the growth and health of Eel[D]. Xiamen: Jimei University, 2019 (in Chinese).
- [34] Hamer H M, Jonkers D M A E, Bast A, *et al.* Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans[J]. *Clinical Nutrition*, 2009, 28(1): 88-93.
- [35] Kawasaki S, Nakagawa T, Nishiyama Y, *et al.* Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in Clostridia[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(4): 368-372.
- [36] Macfarlane S, Macfarlane G T. Regulation of short-chain fatty acid production[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, 62(1): 67-72.
- [37] Delzenne N M, Daubioul C, Neyrinck A, *et al.* Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87(S2): S255-S259.
- [38] Najdegerami E H, Tran T N, Defoirdt T, *et al.* Effects of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(1): 25-33.
- [39] De Schryver P, Sinha A K, Kunwar P S, *et al.* Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1535-1541.
- [40] Titus E, Ahearn G A. Short-chain fatty acid transport in the intestine of a herbivorous teleost[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1988, 135(1): 77-94.
- [41] Titus E, Ahearn G A. Transintestinal acetate transport in a herbivorous teleost: anion exchange at the basolateral membrane[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1991, 156(1): 41-61.
- [42] Chen D F, Jin D C, Huang S M, *et al.* *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota[J]. *Cancer Letters*, 2020, 469: 456-467.
- [43] Han J F, Wang Y W, Song D, *et al.* Effects of

Clostridium butyricum and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune function and volatile fatty acid level of caecal digesta in broilers[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 797-807.

[44] 宋增福. 丁酸梭菌 C₂ 菌株对鲈鱼肠道微生态调控作用与机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

Song Z F. Study of Manipulation and approach to the mechanism of *Clostridium butyricum* strain C₂ on intestinal microecology in *Miichthys miuiy*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006 (in Chinese).

Effects of *Clostridium butyricum* on growth, body index, nutrient utilization, intestinal structure and function of discus fish (*Symphysodon haraldi*)

ZHU Jianguo^{1,2,3}, WEN Bin^{1,2,3,4*}, CHENG Guo^{1,2,3}, GAO Jianzhong^{1,2,3,4*}, CHEN Zaizhong^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To determine the effects of *Clostridium butyricum* on growth, body index, nutrient utilization, and intestinal structure and function of discus fish *Symphysodon haraldi*, *C. butyricum* was added in basic feed for the fish at concentrations of 0 (control), 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 cfu/g, respectively. After 8-week culture, no significant difference was showed on growth and body index of fish in *C. butyricum*-added groups. However, crude protein content and digestibility in 1×10^5 cfu/g group increased significantly. Compared to control, height and width of midgut villi in fish fed with *C. butyricum* was apparently increased and mucopolysaccharide secretion level of fish in 1×10^5 cfu/g group significantly improved. For intestinal digestive and antioxidant enzymes, the trypsin activity of fish in 1×10^5 cfu/g group was greatly improved. Furthermore, the malondialdehyde content in 1×10^6 cfu/g group fish was significantly decreased. Short chain fatty acids (SCFAs) were measured in fish intestinal contents, and it was suggested that acetic acid and propionic acid in 1×10^5 cfu/g group was significantly higher than that in the control group, and the total acid content reached the maximum in this addition group, which was significantly higher than other groups. Studies have shown that under the conditions of this experiment, adding 1×10^5 cfu/g *C. butyricum* to the discus fish bait can improve intestinal structure, intestinal digestion and antioxidant capacity, and increase intestinal SCFAs secretion and nutrition utilization.

Key words: *Symphysodon haraldi*; *Clostridium butyricum*; growth; body index; nutrient utilization; intestinal structure and function

Corresponding authors: WEN Bin. E-mail: bwen@shou.edu.cn;

GAO Jianzhong. E-mail: jzhgao@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Sailing Program (19YF1419400); Shanghai Natural Science Foundation (20ZR1423600)