

文章编号: 1674-5566(2023)06-1195-10

DOI: 10.12024/jsou.20221004008

饲料中添加丁酸梭菌对草鱼生长性能、免疫力及抗嗜水气单胞菌的影响

侯廷龙^{1,2}, 刘惠茹³, 涂彦芳², 张佳颖², 李春涛¹, 迟庆生¹, 吴家乐⁴

(1. 遵义师范学院 生物与农业科技学院, 贵州 遵义 563000; 2. 暨南大学 水生生物研究中心, 广东 广州 510632; 3. 天津农学院 水产学院天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384; 4. 佛山市清舟生态科技有限公司, 广东 佛山 528000)

摘要: 为研究饲料中添加丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)生长性能及血清酶活、免疫功能和抗病能力的影响, 选用初始体质量为(23.78±0.68)g的健康草鱼600尾, 随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复50尾。对照组(T0组)只投喂基础饲料, 实验组(T1、T2、T3组)分别投喂添加 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 cfu/g 丁酸梭菌的饲料, 实验周期为56 d。结果表明: 与T0组相比, T1、T2和T3组草鱼的增重率(WGR)和特定增长率(SGR)显著增加, 存活率(SR)无显著差异。与T0组相比, T1、T2和T3组草鱼的血清超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、溶菌酶(LZM)活性显著增高, 补体C3含量显著增高, 但谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性显著降低。与T0组相比, T1、T2和T3组草鱼的免疫相关基因白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、免疫球蛋白M(IgM)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的mRNA相对表达量显著上调。投喂益生菌56 d后, 用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对草鱼进行攻毒实验, 与T0组相比, T1、T2和T3组草鱼的累积死亡率显著降低。综上所述, 饲料中添加丁酸梭菌可以提高草鱼的生长性能、血清抗氧化能力、机体免疫力以及抗病能力。

关键词: 丁酸梭菌; 草鱼; 生长性能; 血清抗氧化能力; 免疫功能; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S 963 **文献标志码:** A

水产养殖是世界上增长最快的食品生产工业之一, 水产品是人类消费的主要蛋白质来源, 鱼类作为人类食物来源的重要性日益增加^[1]。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肉质鲜美、生长迅速、产量高、价格低, 已被引种到100多个国家, 作为最重要的淡水养殖品种之一, 在我国水产养殖业中占有举足轻重的地位, 约占我国淡水鱼总产量的20%^[2]。然而, 随着养殖规模日益集约化, 草鱼的养殖生产近年来受到病毒、细菌等流行病的影响, 造成严重的经济损失, 例如草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)等是目前草鱼养殖的主要病害^[3]。嗜水气单胞菌是一种常见的鱼类病原体, 可引起草鱼出血性败

血症, 从而影响其生长, 导致养殖草鱼的高死亡率^[4]。抗菌药物、杀虫剂、消毒剂 and 化学药品在防病促长方面的过度和不当使用, 导致草鱼产生耐药性^[4]。为了解决这些问题, 已经开发了许多对环境友好的细菌性疾病的生物控制方法, 其中使用益生菌在水产养殖中取代抗生素方面的研究受到了广泛地关注^[5]。

作为抗生素的替代品, 益生菌、益生元和药用植物是控制或治疗水产动物不同疾病最有前景的饲料补充剂^[5-6]。益生菌作为活的微生物制剂, 可以通过维持肠道菌群平衡、稳定肠黏膜屏障功能、增强免疫反应、改善水产养殖的水质、防止水生动物病原微生物的传染性继承来改善宿主健康^[5,7-8]。丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)是

收稿日期: 2022-10-28 修回日期: 2023-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(32260261); 贵州省教育厅项目(黔教合KY字[2019]050号, 黔教合KY字[2012]017-3号)

作者简介: 侯廷龙(1993—), 男, 博士研究生, 研究方向为水产病害。E-mail: houtinglong555@163.com

通信作者: 李春涛, E-mail: chuntao323@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

研究最多的产丁酸菌之一,是一种厌氧的革兰氏阳性杆菌,具有产生氨基酸、维生素、短链脂肪酸、调节机体免疫力、维持健康等功能^[9]。它已被广泛用作水产动物和牲畜的饲料添加剂,用于治疗肠道炎症,可提高肠道消化酶活性和抗应激能力,并调节肠道微生物群的组成。此外,丁酸梭菌还可以产生多种酶和营养物质,又可以抑制有害菌、增殖有益菌^[10]。研究^[11]表明,在饲料中添加丁酸梭菌后,鲢(*Miichthys miuiy*)和南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)受到病原菌感染后存活率显著性提高。短期补充丁酸梭菌也提高了异育银鲫的抗病性^[12]。丁酸梭菌作为新型的饲料添加剂具有非常广阔的前景。因此,本实验通过在饲料中分别添加 1×10^7 、 1×10^8 和 1×10^9 cfu/g 丁酸梭菌,研究其对草鱼生长性能、免疫功能及抗病性的影响,评估丁酸梭菌在食用饲料中的适宜添加水平,旨在为丁酸梭菌在草鱼的配合饲料中应用提供相关的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

丁酸梭菌采购于碧沃丰生物科技(广东)股份有限公司,其中菌数量 5.0×10^9 cfu/g。嗜水气单胞菌为本实验室保藏菌株。实验草鱼来自遵义金鼎镇合江源养殖场。

1.2 实验饲料

基础饲料组成及营养水平见表1,本实验采用含丁酸梭菌饲料投喂草鱼。对照组T0投喂基础饲料,实验组T1、T2和T3分别投喂添加 1×10^7 、 1×10^8 和 1×10^9 cfu/g的丁酸梭菌的饲料。添加方法为将基础饲料原料经过粉碎机粉碎后过60目筛,根据添加量为 1×10^7 、 1×10^8 和 1×10^9 cfu/g的丁酸梭菌原料按照由少到多的比例分步用混合机充分混合均匀后,然后添加蒸馏水200 g/kg,混合均匀后加工成直径2.0 mm左右的颗粒饲料烘干,-20℃保存备用。

草鱼在实验条件下驯养2周并投喂基础饲料。在适应养殖系统后,将600尾初始平均体质量为 (23.78 ± 0.68) g的健康草鱼随机分成4组,每组3个重复,每个重复50尾,进行养殖。每天7:00、19:00投喂饲料达到明显饱腹感为止,投喂56 d。实验过程中,水温和pH保持在 (25 ± 2) ℃和7.0~7.5,溶解氧含量保持在7 mg/L以上,氨氮 < 0.2 mg/L,

亚硝酸盐 < 0.005 mg/L,每天换三分之一经过曝气的自来水。

表1 基础饲料组成及营养水平
Tab. 1 Composition and nutrient levels of the basal diet

项目 Items	含量 Contents	%
原料(干物质基础) Ingredients (DM basis)		
豆粕 Soybean meal	25.0	
鱼粉 Fish meal	20.5	
菜粕 Rapeseed meal	20.0	
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	6.0	
小麦粉 Wheat flour	21.0	
预混料 Premix	2.0	
豆油 Soybean oil	2.5	
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	2.0	
氯化胆碱 Choline chloride	1.0	
合计 Total	100	
营养水平 Nutritional levels		
粗蛋白质 Crude protein	29.24	
粗脂肪 Crude lipid	3.83	
灰分 Ash	13.71	
水分 Moisture	9.56	

注:预混料为每千克饲料提供 V_A 1 500 IU, V_{D_3} 300 IU, V_E 750 mg, V_K 35 mg, Fe 2.5 g, Cu 0.075 g, Zn 0.75 g, Mn 0.5 g, Mg 5 g, I 22.5 mg, Se 3.5 mg, Co 7.5 mg。

Notes: The premix provides the following per kg of diets V_A 1 500 IU, V_{D_3} 300 IU, V_E 750 mg, V_K 35 mg, Fe 2.5 g, Cu 0.075 g, Zn 0.75 g, Mn 0.5 g, Mg 5 g, I 22.5 mg, Se 3.5 mg, Co 7.5 mg.

1.3 样品采集

投喂实验结束时,所有鱼禁食24 h,然后在解剖前用MS-222溶液麻醉。在饲养14、28、42和56 d时,从每个重复中随机捞取3尾鱼,用无菌注射器尾静脉采血,随后放入4℃冰箱,静置12 h,4℃条件下3 500 r/min离心10 min,取上层血清分装,置于-80℃超低温冰箱保存用于测酶活,鱼皮用70%乙醇清洗,立即用无菌剪刀打开腹部,收集脾脏样品在液氮中冷冻,然后快速转移到-80℃冰箱中保存,以便进行后续RNA提取。

1.4 指标测定

1.4.1 生长性能

在养殖实验结束后测定实验鱼体质量(Body mass, BM),并对各组鱼进行计数,计算存活率(Survival rate, SR)、增重率(Weight gain rate, WGR)和特定生长率(Specific growth rate, SGR),计算公式:

$$R_{WC} = (m_t - m_0) / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$R_{SC} = (\ln m_1 - \ln m_0) / d \times 100\% \quad (2)$$

$$R_s = n_1 / n_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: R_{WC} 为增重率,%; m_1 为终末体质量,g; m_0 为初始体质量,g; R_{SC} 为特定增长率,%; d 为养殖天数,d; R_s 为存活率,%; n_1 为终末尾数,尾; n_0 为初始尾数,尾。

1.4.2 酶活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、溶菌酶(LZM)、补体C3活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.5 免疫相关基因表达水平的测定

用Trizol试剂(Invitrogen)提取总RNA,根据Promega M-MLV RT说明书逆转录成cDNA,用于实时荧光定量PCR分析。qPCR的引物序列运用Primer Premier 5.0软件设计(表2)。根据制造商的说明,利用SYBR Green(TOYOBO)进行qPCR反应,扩增程序:95℃预变性4 min,然后变性95℃ 10 s,退火56℃ 20 s,延伸72℃ 30 s,共40个循环。实验采用 β -actin作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量^[13]。

1.6 感染实验

饲养实验结束后,进行为期14 d的嗜水气单胞菌感染实验。每个组留30尾草鱼,每组3个平行,所有组鱼均腹腔注射0.2 mL浓度为 1×10^7 cfu/mL嗜水气单胞菌悬浮液。每天投喂以及充气换水,攻毒后每日观察实验鱼的发病死亡情况。

表3 饲料添加丁酸梭菌56天后对草鱼生长性能的影响

Tab. 3 Effect of feed on growth performance after 56 days

$n=3$

项目 Items	T0	T1	T2	T3
初始体质量 Initial body mass/g	23.78±0.68 ^a	24.12±0.83 ^a	24.00±0.46 ^a	23.98±0.86 ^a
终末体质量 Final body mass/g	34.97±0.53 ^a	37.17±0.70 ^b	37.32±0.27 ^b	37.08±0.52 ^b
增重率 WGR/%	47.08±1.73 ^a	54.15±1.49 ^b	55.52±2.07 ^b	54.69±2.36 ^b
特定增长率 SGR/%	0.68±0.02 ^a	0.77±0.02 ^b	0.78±0.02 ^b	0.77±0.02 ^b
存活率 SR/%	97.55±1.13 ^a	98.66±0.54 ^a	98.44±0.31 ^a	98.66±0.54 ^a

注:同行数据字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Notes: Values with different letters within the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

2.2 饲料添加丁酸梭菌对草鱼血清酶活指标的影响

由图1可知,与对照组T0相比,T1、T2和T3组草鱼血清中SOD的活性显著提高($P<0.05$),并随养殖时间延长呈现先增高后降低趋势,在第14天达到峰值(图1a)。与对照组T0相比,T1、T2和T3组草鱼血清中CAT的活性显著提高($P<0.05$)且各实验组的草鱼CAT活性随着丁酸梭菌添加

表2 RT-PCR引物序列

Tab. 2 RT-PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	序列号 Number
<i>IL-1β-F</i>	GGAGAATGTGATCGAAGAGCGT	EU047716
<i>IL-1β-R</i>	GCTGATAAACCATCCGGGA	
<i>IL-8-F</i>	ATCCACGCTGTCCGCTCA	EU047717
<i>IL-8-R</i>	TCTTTACAGTGAGGGCTA	
<i>TNF-α-F</i>	ACGCTCAACAAGTCTCAG	EU047718
<i>TNF-α-R</i>	CTGGCTGTAGACGAAGTAA	
<i>β-actin-F</i>	GATGATGAAATTGCCGCACTG	M25013
<i>β-actin-R</i>	ACCGACCATGACGCCCTGATGT	
<i>IgM-F</i>	TAGCTCCAATCCACCACCC	DQ417927.1
<i>IgM-R</i>	TCCATTTGAAAGTAAGCGAGTC	

1.7 数据处理与分析

实验结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用SPSS 22.0统计软件对所有数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),随后采用Duncan氏进行多重比较,显著性水平定义为 $P<0.05$ 。

2 结果

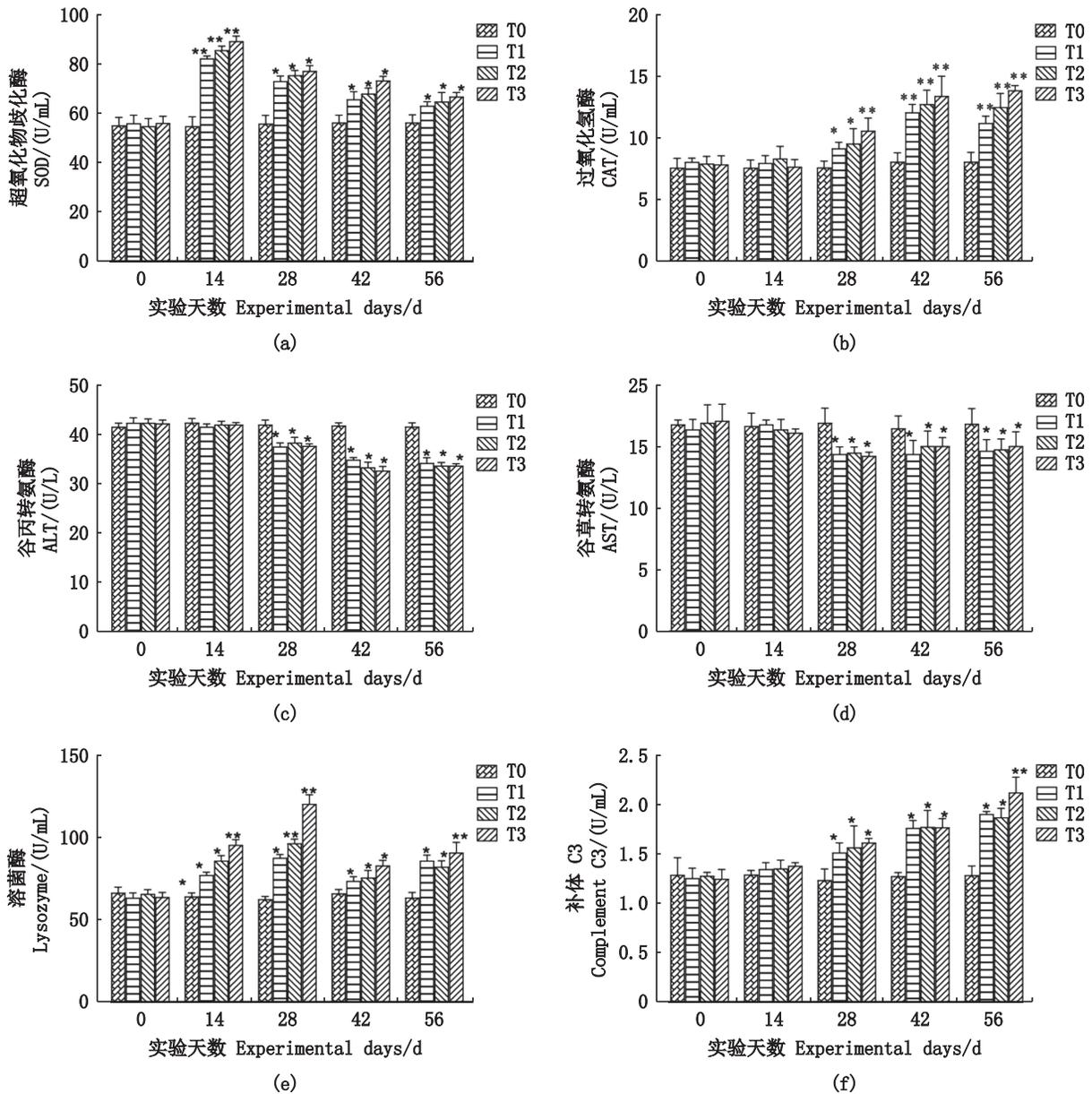
2.1 饲料添加丁酸梭菌对草鱼生长性能的影响

由表3可知,与T0组相比,各实验组的草鱼增重率和特定增长率显著升高($P<0.05$),各实验组之间草鱼的增重率和特定增长率无显著差异($P>0.05$)。对照组与实验组在存活率上无显著差异($P>0.05$)。

量增加而提高,在添加量为 1×10^9 cfu/g时达到最大(图1b)。与对照组T0相比,在第0天和14天,T1、T2和T3组草鱼血清ALT活性没有显著差异($P>0.05$),而在第28、42、56天时,所有实验组血清ALT活性显著低于T0组($P<0.05$),见图1c。与对照组T0相比,在第0天和14天,实验组草鱼血清AST活性没有显著差异($P>0.05$),而在第28、42和56天时,所有实验组血清AST活性显著低于

T0组($P<0.05$),见图1d)。与对照组T0相比,所有实验组中草鱼血清溶菌酶活性均显著性升高,呈现先增高后降低趋势,在第28天达到峰值(图1e)。与对照组T0相比,第28、42、56天所有实验

组草鱼血清中补体C3显著升高($P<0.05$),第14天与对照组无显著性差异($P>0.05$),随养殖时间延长补体C3也呈现逐渐增高的趋势,在56天达到峰值(图1f)。



* 表示与对照组差异显著($P<0.05$);** 表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。

* means significant difference compared with the control ($P<0.05$); ** means extremely significant difference compared with the control ($P<0.01$).

图1 饲料中添加丁酸梭菌对草鱼血清酶活的影响

Fig. 1 Effects of *C. butyrate* on serum enzyme activities of Grass Carp

2.3 饲料添加丁酸梭菌对草鱼免疫基因的影响

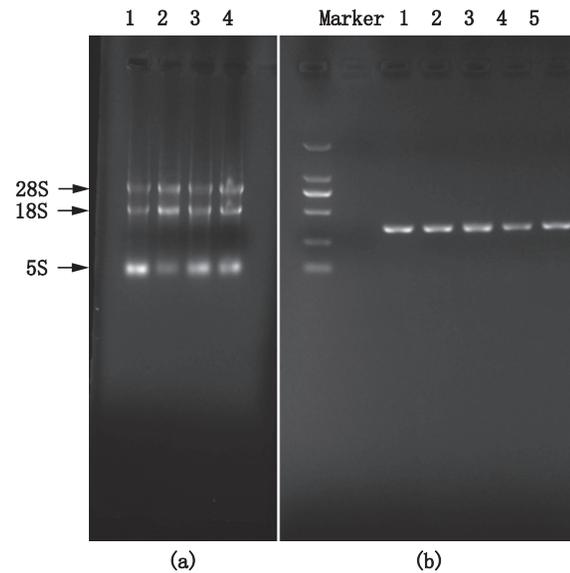
如图2所示,Trizol法提取的草鱼总RNA经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,图中3条亮带从上至下依次为28S、18S、5S,电泳显示RNA的完整性较好,可用于下一步实验(图2a)。将总RNA

逆转录成cDNA后经内参基因 β -actin验证,条带单一逆转录成功,可用于后续qPCR实验(图2b)。在整个实验过程中,与对照组T0相比,在T1、T2和T3组中 $IL-1\beta$ 和 $IL-8$ 表达显著增加($P<0.05$),见图3a和3b,随着添加菌量增多 $IL-1\beta$ 和

IL-8 出现增加趋势;呈现先增高后降低趋势,且都在第 14 天达到峰值,*IL-1 β* 和 *IL-8* 分别提高到 2.3 倍和 2.8 倍 ($P<0.05$)。同样,在第 14、28、42 和 56 天,与对照组 T0 相比,在所有实验组中 *TNF- α* 表显著上调,呈现先增高后降低趋势,在第 28 天出现峰值,*TNF- α* 提高到 2.7 倍 ($P<0.05$),见图 3c。同样,*IgM* 也有类似的趋势,都是先升高后降低,与对照组 T0 相比,所有实验组均显著升高,在第 28 天出现峰值,提高到 2.6 倍 ($P<0.05$)(图 3d)。

2.4 饲料中添加丁酸梭菌对草鱼抗病力的影响

嗜水气单胞菌感染草鱼 14 d 后,实验组的累计死亡率显著低于(分别为 56.7%、46.7% 和 36.7%)对照组(73.3%, $P<0.05$)。而且,各实验组 T1、T2 和 T3 组之间也差异显著 ($P<0.05$),T3 组草鱼累计死亡率最低。见图 4。

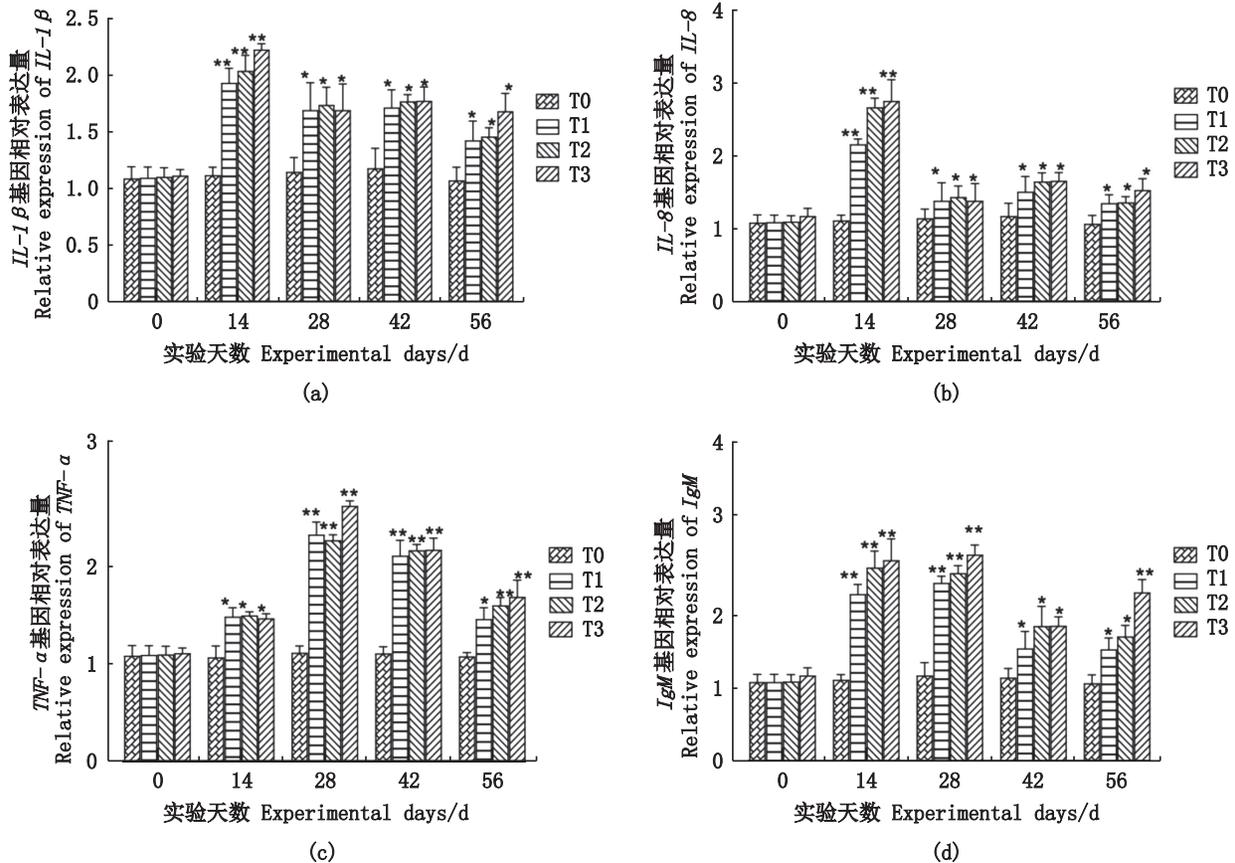


(a)1~4泳道为RNA;(b)1~5泳道为 β -actin。

(a)1-4: RNA; (b)1-5: β -actin.

图2 草鱼总RNA和 β -actin验证cDNA核酸电泳图

Fig. 2 Grass carp nucleic acid electrophoresis of total RNA and β -actin verification cDNA

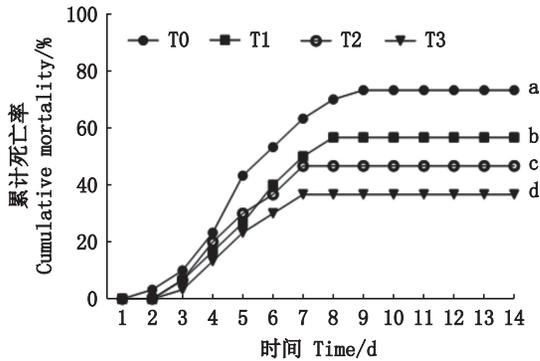


* 表示与对照组差异显著($P<0.05$);** 表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。

* means significant difference compared with the control ($P<0.05$); ** means extremely significant difference compared with the control ($P<0.01$).

图3 饲料中添加丁酸梭菌对草鱼免疫基因表达水平的影响

Fig. 3 Effects of *C. butyrate* on grass carp immune gene expression level



不同字母有显著性差异($P < 0.05$)。

Different letters representing significant differences ($P < 0.05$).

图4 饲料中添加丁酸梭菌对草鱼抗病力的影响

Fig. 4 Effect of *C. butyrate* supplementation on grass carp disease resistance

3 讨论

3.1 饲料添加丁酸梭菌对草鱼生长性能的影响

丁酸梭菌作为一种益生菌已广泛应用于水产养殖业中^[9]。在之前的研究中,已经报道了许多关于丁酸梭菌在水生动物上应用的研究。如在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的研究中,饲料中添加 4.8×10^6 CFU/kg的丁酸梭菌可显著提高其生长性能和饲料利用率^[14];同样,在卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)的饲料中添加 2×10^7 CFU/g的丁酸梭菌提高了卵形鲳鲹的生长性能和饲料利用率^[15];在饲料中添加 $1.7 \times 10^8 \sim 3.1 \times 10^8$ CFU/kg的丁酸梭菌可以显著提高罗非鱼(*Oreochromis nilotica*)的生长性能和饲料利用率^[16];在斑节对虾(*Penaeus monodon*)中投喂 1×10^9 CFU/g丁酸梭菌也显著提高了其生长性能^[10]。在本研究中,饲料中添加丁酸梭菌也能够显著提高草鱼的增重率和特定生长率,表明丁酸梭菌有助于提高草鱼的生长性能。丁酸梭菌对生长性能的积极作用可能与肠道中该益生菌代谢产生的短链脂肪酸如乙酸、丙酸和丁酸有关。短链脂肪酸能为肠道细胞代谢提供能量来源,提高肠道消化酶的活性,从而促进动物对饲料中营养物质的吸收利用而加快其生长^[17]。

3.2 饲料添加丁酸梭菌对草鱼血清酶活性的影响

鱼类的血液指标与机体代谢、健康状况以及疾病关系密切,因此,血清指标通常作为衡量鱼体营养状况、健康状况和对环境适应状况的关键指数^[14]。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种具有催化功能

的蛋白质^[18],广泛存在各生物体内,可通过移除体内的超氧阴离子自由基,维持生物体中自由基数量的动态平衡,具有保护暴露于氧气中的细胞和防止衰老的作用^[19]。过氧化氢酶(CAT)是催化细胞内过氧化氢分解的一种酶,防止机体过氧化,保护机体免受氧化物的毒害^[20]。本研究中,由图1a所示,随着添加菌量增多SOD和CAT出现增加趋势;当饲料中添加 1.0×10^9 cfu/g丁酸梭菌时,血清SOD在第14天时达到峰值且提高到1.5倍,血清CAT在第56天时达到峰值且提高到1.4倍。表明添加益生菌时,可以提高草鱼血清中SOD和CAT的活性,结果与黄颡鱼、银鲳、卵形鲳鲹和斑节对虾的研究结果一致^[10,14-15,21]。另外也有研究^[22]报道,在饲料中添加其他益生菌(地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌),草鱼的SOD活性也显著增高。饲料中添加丁酸梭菌能够提高草鱼的抗氧化能力,可能是由于丁酸梭菌能够清除动物体内的活性氧自由基,降低脂质过氧化反应,而且其代谢产物丁酸也有通过增加抗氧化酶活性和减少活性氧产物,进而调节氧化胁迫的功能。在其他的研究中也有类似的结果,添加了益生菌后CAT活性增强,表明饲料中添加丁酸梭菌可以抑制自由基的形成,降低过氧化的损害。

补体是先天免疫防御中重要的体液功能分子,在被病原体或者抗原抗体复合物等多种物质激活后能诱导炎症反应和抗体的形成、介导病原体的清除^[8,23]。如图1f所示,第28、42、56天各实验组补体C3水平显著高于对照组。这与石斑鱼(*Epinephelus drummondhayi*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和金头鲷(*Sparus aurata*)的研究结果相似,益生菌可以增强鱼类的天然补体活性^[24-26]。丁酸梭菌作为免疫增强剂添加到饲料中,可以增强水生动物体的补体活性,提高水生动物体的自身免疫力。

溶菌酶是一种蛋白水解酶,存在于鱼类的体表黏液、肠道黏液、血清和巨噬细胞中,它在鱼类体内的主要作用是杀灭病原微生物,是鱼类抵御病原微生物侵染的重要非特异性免疫因子^[27-28]。在本研究中,所有实验组溶菌酶活性显著提高,T3组溶菌酶活性最高。在第14、28、42、56天各实验组的溶菌酶活性随着饲料添加量的增加而增高,呈现先增高后降低趋势,在第28天达到峰值。在南美白对虾^[29]和鲤^[25]中观察到了相似的结果,投喂益生菌后分别在喂食1~4周和7~21 d

溶菌酶水平显著提高。在其他研究^[30]也有报道,饲料中添加其他益生菌也显著提高鲢鱼血清溶菌酶活性,且随添加剂量的增加溶菌酶活性也呈升高趋势^[30]。添加丁酸梭菌后草鱼血清溶菌酶活性均显著升高,表明丁酸梭菌能够有效提高草鱼的非特异性免疫反应。

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)常被用作蛋白质功能代谢和肝脏功能改变的重要指标^[31]。正常情况下,这两种酶主要在鱼类的肝脏中表达,但是,当机体受外界物质入侵或病原胁迫时,肝脏细胞通透性增强,向血液中转移大量的AST和ALT,使血清AST和ALT活性增加,低活性的AST和ALT对鱼类的生长有着积极影响^[22]。本研究中,实验组中草鱼的血清AST活性在第28、42和56天时显著降低。实验组的草鱼ALT酶活性在投喂添加丁酸梭菌的饲料第14天内没有明显变化($P>0.05$),而在第28、42、56天时,所有实验组血清AST活性低于T0组($P<0.05$)。在其他的研究报告中也有类似的结果,添加了益生菌后AST的活性降低^[14,32]。推测饲料添加丁酸梭菌有助于保护草鱼肝脏功能和促进生长。

3.3 饲料添加丁酸梭菌对草鱼免疫基因的影响

众所周知,细胞因子 $IL-1\beta$ 在鱼类和哺乳动物的免疫反应中发挥着重要作用^[33]。它作为响应组织损伤和病原体入侵的重要介质,可以通过诱导其他能够触发巨噬细胞、淋巴细胞和NK细胞的细胞因子的释放或通过激活淋巴细胞来刺激免疫反应^[34]。在本研究中,实验组的 $IL-1\beta$ 表达显著高于对照组。类似地,在LIU等^[35]的研究中,用添加短乳杆菌和嗜酸乳杆菌的饲料投喂杂交罗非鱼幼鱼10 d, $IL-1\beta$ 基因表达显著上调。在另一个研究中,饲料中添加黄杆菌会使鲤 $IL-1\beta$ 的表达也显著增加^[25]。白细胞介素8是一种中性粒细胞趋化因子,可以特异性趋化中性粒细胞进入到机体中的炎症部位,促使中性粒细胞脱颗粒,并产生超氧阴离子,同时引起呼吸爆发等,在免疫反应中发挥重要作用^[36]。 $IL-8$ 是另一种白细胞介素型细胞因子,与对照组相比,在所有实验组均显著上调。这与另一个研究^[37]结果类似,草鱼投喂枯草芽孢杆菌后, $IL-8$ 的表达也上调。 $TNF-\alpha$ 是一种多功能的促炎因子,能够参与先天免疫,并引起细胞凋亡,其在调节炎症反应和细胞免疫反应时具有多种功能^[38]。与 $IL-1\beta$ 类似,

$TNF-\alpha$ 基因在炎症事件中也起着至关重要的作用。本研究结果表明,所有实验组 $TNF-\alpha$ 基因表达在投喂14 d后显著高于对照组。在幼鱼杂交罗非鱼、草鱼和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中投喂益生菌也观察到了类似的结果^[35,37,39]。上述研究表明饲料中添加丁酸梭菌可以增强机体免疫因子调节免疫反应。

众所周知,免疫球蛋白可以保护动物和人类免受各种疾病的侵害,鱼类血清Ig水平提供了有关体液免疫状态的关键信息^[30]。Ig在预防细菌、寄生虫和病毒感染以及从疾病中恢复方面都很重要。IgM是主要的免疫球蛋白,也是迄今为止循环系统中体积最大的抗体。先前已在各种鱼类中报道了在投喂益生菌后刺激了免疫球蛋白水平^[30,40]。在本研究中,喂食14 d后,投喂益生菌饲料的鱼血清IgM表达显著高于对照组,这与之前的研究一致^[11,14,24,30,41]。上述结果表明饲料中添加适量的丁酸梭菌可提高草鱼的免疫力,有助于提高其抗病力。

3.4 饲料添加丁酸梭菌对草鱼抗病性的影响

所有添加益生菌组草鱼用嗜水气单胞菌进行14 d感染后,草鱼的累计死亡率与对照组相比显著降低,T3组的草鱼累计死亡率最低。丁酸梭菌保护草鱼免受嗜水气单胞菌侵害的原因可能是其改善了宿主先天免疫应答或提升了免疫相关基因表达量。在虎龙斑饲料中添加丁酸梭菌可以降低哈维氏弧菌攻毒后的累积死亡率^[42]。在虎龙斑饲料中添加芽孢杆菌和光合细菌也能提高哈维氏弧菌攻毒之后鱼的成活率^[42]。在饲料中添加芽孢杆菌也能够显著提高罗非鱼、虹鳟鱼和虾的抗病力^[43-45]。这些结果表明饲料中添加丁酸梭菌可降低草鱼的累计死亡率,增强其抗病能力^[25,29]。

饲料中添加丁酸梭菌可以显著增加草鱼的WGR和SGR,提高血清SOD和LZM的活性以及C3含量,降低AST的活性,显著增加了免疫相关基因 $IL-8$ 、 $IL-1\beta$ 、IgM和 $TNF-\alpha$ 的表达,显著增加了抗病性。综上所述,饲料中添加丁酸梭菌可以显著促进草鱼的生长,增强机体免疫力,提高机体抗氧化能力和抗病能力。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] SU H, YAKOVLEV I A, VAN EERDE A, et al. Plant-produced vaccines: future applications in aquaculture [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 718775.
- [3] LUO N, WANG L, WANG Z Y, et al. Effects of dietary supplementation of duo-strain probiotics with post-spraying technology on growth performance, digestive enzyme, antioxidant capacity and intestinal microbiota of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 26: 101301.
- [4] KONG W G, LI S S, CHEN X X, et al. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(5): 1223-1235.
- [5] DONE H Y, VENKATESAN A K, HALDEN R U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? [J]. *The AAPS Journal*, 2015, 17(3): 513-524.
- [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] NEWAJ-FYZUL A, AL-HARBI A H, AUSTIN B. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2014, 431: 1-11.
- [8] NAYAK S K. Probiotics and immunity: a fish perspective [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2-14.
- [9] 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.
- [10] DUAN Y F, ZHANG J S, HUANG J H, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* on the growth, digestive enzyme activity, antioxidant capacity, and resistance to nitrite stress of *Penaeus monodon* [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(3): 938-945.
- [11] PAN X, WU T, SONG Z, et al. Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyrium* CB2 [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(9): 679-686.
- [12] LI T, KE F, GUI J F, et al. Protective effect of *Clostridium butyricum* against *Carassius auratus* herpesvirus in gibel carp [J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(3): 905-914.
- [13] ZHANG Z H, ZHANG Q Z. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green [J]. *Gene*, 2012, 497(2): 172-180.
- [14] 王海瑞, 莫文艳, 赵红霞, 等. 饲料添加丁酸梭菌对黄颡鱼生长性能及血清生化指标、免疫功能和抗氧化能力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2022, 34(8): 5295-5303.
- WANG H R, MO W Y, ZHAO H X, et al. Effects of adding *Clostridium butyricum* in diets on growth performance, serum biochemical indices, immune function and antioxidant ability of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(8): 5295-5303.
- [15] 吴杨, 杨铿, 黄小林, 等. 饲料中添加丁酸梭菌对卵形鲳鲹幼鱼生长性能和肠道菌群的影响 [J]. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 155-162.
- WU Y, YANG K, HUANG X L, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance and intestinal flora of juvenile *Trachinotus ovatus* [J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 155-162.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] ZHAO H Q, ZHANG R F, YAN X Y, et al. Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(35): 6939-6957.
- [19] IGHODARO O M, AKINLOYE O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018, 54(4): 287-293.
- [20] DAVID M, MUNASWAMY V, HALAPPA R, et al. Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92(1): 15-18.
- [21] GAO Q X, XIAO Y P, SUN P, et al. In vitro protective efficacy of *Clostridium butyricum* against fish pathogen infections [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2013, 53(4): 453-459.
- [22] BUCHER F, HOFER R. Effects of domestic wastewater on serum enzyme activities of brown trout (*Salmo trutta*) [J].

- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1990, 97(2): 381-385.
- [23] 贾聪慧, 杨彩梅, 曾新福, 等. 丁酸梭菌对肉鸡生长性能、抗氧化能力、免疫功能和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(3): 908-915.
- JIA C H, YANG C M, ZENG X F, et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidant capacity, immune function and serum biochemical parameters of broilers [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(3): 908-915.
- [24] SUN Y Z, YANG H L, MA R L, et al. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 803-809.
- [25] CHI C, JIANG B, YU X B, et al. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 9-18.
- [26] SALINAS I, ABELLI L, BERTONI F, et al. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1/2): 114-123.
- [27] LINDSAY G J H. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence [J]. Aquaculture, 1986, 51(3/4): 169-173.
- [28] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 868-874.
- [29] HAO K, LIU J Y, LING F, et al. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 141-149.
- [30] SONG Z F, WU T X, CAI L S, et al. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Müichthys müuy* [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2006, 7(7): 596-602.
- [31] JOSEPH B, RAJ S J. Effect of curacron toxicity on aminotransferases (ALT and AST) in the serum of the fish *Cyprinus carpio* [J]. International Journal of Biological Chemistry, 2011, 5(3): 207-211.
- [32] WANGARI M R, GAO Q, SUN C X, et al. Effect of dietary *Clostridium butyricum* and different feeding patterns on growth performance, antioxidant and immune capacity in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. Aquaculture Research, 2021, 52(1): 12-22.
- [33] SECOMBES C J, WANG T, HONG S, et al. Cytokines and innate immunity of fish [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8/9): 713-723.
- [34] YUAN C T, PAN X P, GONG Y, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. International Immunopharmacology, 2008, 8(1): 51-58.
- [35] LIU W S, REN P F, HE S X, et al. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(1): 54-62.
- [36] HARADA A, SEKIDO N, AKAHOSHI T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation [J]. Journal of Leukocyte Biology, 1994, 56(5): 559-564.
- [37] SHI F, ZI Y J, LU Z J, et al. *Bacillus subtilis* H2 modulates immune response, fat metabolism and bacterial flora in the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 8-20.
- [38] ZOU J, PEDDIE S, SCAPIGLIATI G, et al. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(9): 813-822.
- [39] TADESE D A, SUN C X, LIU B, et al. Combined effects of emodin and *Clostridium butyricum* on growth and non-specific immunity of giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture, 2020, 525: 735281.
- [40] PANIGRAHI A, KIRON V, PUANGKAEW J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2005, 243(1/4): 241-254.
- [41] GIRI S S, SUKUMARAN V, OVIYA M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 660-666.
- [42] 黄灵. 饲料中添加益生菌对虎龙斑 (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) 幼鱼生长、非特异性免疫和抗病力影响的研究[D]. 广州: 广州大学, 2017.
- HUANG L. The effects of dietary probiotics on growth, non-specific immunity and disease resistance of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) [D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2017.
- [43] RENGPIPAT S, RUKPRATANPORN S, PIYATIRATTIVORAKUL S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.

- [44] NEWAJ-FYZUL A, ADESIYUN A A, MUTANI A, et al. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103 (5) : 1699-1706.
- [45] TSENG D Y, HO P L, HUANG S Y, et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26 (2) : 339-344.

Effect of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on grass carp growth performance, immunity, and resistance against *Aeromonas hydrophila*

HOU Tinglong^{1,2}, LIU Huiru³, TU Yanfang², ZHANG Jiaying², LI Chuntao¹, CHI Qingsheng¹, WU Jiale⁴

(1. School of Biology and Agricultural Science and Technology, Zunyi Normal University, Zunyi 563000, Guizhou, China; 2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Fisheries Ecology and Breeding, School of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 4. Foshan Qingzhou Ecological Technology Co., LTD., Foshan 528000, Guangdong, China)

Abstract: This experiment was used to study the effects of dietary *Clostridium butyricum* addition on growth performance, serum biochemical indices, immune function and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), in order to provide theoretical reference for application of *C. butyricum* in aquaculture. A total of 600 healthy grass carp with similar body mass of (23.78±0.68) g were randomly divided into 4 groups with 3 repeats for each group and 50 fish per repeat. Grass carp in the control group (T0 group) were fed a basal diet, while others in experimental groups (T1, T2, T3 groups) were fed basal diets added 1×10⁷, 1×10⁸, 1×10⁹ cfu/g *C. butyricum*, respectively. The experimental period lasted for 56 d. The results showed as follows: Dietary adding *C. butyricum* had significant effects on the weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) of grass carp, while had no important effect on survival rate (SR). Conversely with the control group, the activities of superoxide dismutase (SOD) and lysozyme (LZM), as well as the content of complement C3 were significantly higher in the experimental groups, while the activity of aspartate aminotransferase (AST) was significantly decreased. The expression of 4 immune-related genes (*IL-8*, *IL-1β*, *IgM* and *TNF-α* genes) in the experimental groups were significantly higher than that in the control group. After feeding probiotics for 56 days, the grass carp were challenged with *Aeromonas hydrophila*. The results indicated that the cumulative mortality rate of grass carp in the experimental groups were lower than the control group. Based on the results of this experiment, feeding basal diets added *C. butyricum* has a good impact on growth, immunity and disease resistance improvement for grass carp.

Key words: *Clostridium butyricum*; *Ctenopharyngodon idella*; growth performance; serum antioxidant capacity; immune function; *Aeromonas hydrophila*