

袁海林, 李向策, 孙秋璇, 等. 丁酸梭菌芽孢对凡纳滨对虾生长性能、血清生化指标、肠道菌群及短链脂肪酸含量的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 212-220.

YUAN Hailin, LI Xiangce, SUN Qiuxuan, et al. Effects of *Clostridium butyricum* spores on growth performance, biochemical parameters in serum, intestinal flora and short-chain fatty acid content of *Penaeus vannamei* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 212-220.

丁酸梭菌芽孢对凡纳滨对虾生长性能、血清生化指标、肠道菌群及短链脂肪酸含量的影响

袁海林¹, 李向策¹, 孙秋璇¹, 谭小红¹, 苏友禄¹, 黄燕华¹, 尹文飞², 周 萌¹

(1 仲恺农业工程学院 动物科技学院 健康养殖创新研究院/广州市水产病害与水产养殖重点实验室/

广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广东 广州 510225;

2 广东大泽农生物科技有限公司, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】研究饲用丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* (CB) 芽孢对凡纳滨对虾幼虾生长性能、血清生化指标、肠道菌群组成及 5 种短链脂肪酸含量的影响。【方法】分别将质量分数为 0(对照)、0.050%、0.075% 和 0.100% 的丁酸梭菌芽孢制剂添加到基础饲料中(饲料中的活菌数分别为 0、 2.50×10^5 、 3.75×10^5 、 5.00×10^5 CFU/g), 饲喂初始体质量为 (1.42 ± 0.02) g 的凡纳滨对虾幼虾 30 d, 然后检测生长性能、血清生化指标、肠道菌群组成以及短链脂肪酸含量。【结果】与对照组相比, 饲喂 30 d 后对虾的体质量在 0.050% 和 0.075% CB 组显著提高 ($P<0.05$), 质量增加率则在 0.050% CB 组显著提高 ($P<0.05$); 0.075% CB 组对虾的血清葡萄糖、0.100% CB 组的血清尿素氮浓度显著降低 ($P<0.05$), 0.050% CB 组血清磷浓度显著上升 ($P<0.05$)。与对照组相比, 0.050% CB 组浮霉菌门 Planctomycetes 和 骸骨菌门 Patescibacteria 丰度显著提高 ($P<0.05$); 0.050% 和 0.075% CB 组弧菌属 *Vibrio* 的丰度显著降低 ($P<0.05$)。多样性分析表明, 0.050% 和 0.075% CB 组的肠道菌群组成相似度更高, 且明显不同于对照组和 0.100% CB 组。肠道内容物中 5 种短链脂肪酸的含量均随丁酸梭菌添加量的升高而增加。【结论】饲料中添加 CB 芽孢制剂可能通过抑制肠道内潜在病原菌丰度、提高肠道短链脂肪酸的含量, 改善营养物质的利用, 从而提高凡纳滨对虾的生长性能。本研究中 CB 芽孢制剂在饲料中的适宜添加量为 2.50×10^5 或 3.75×10^5 CFU/g。

关键词: 凡纳滨对虾; 丁酸梭菌芽孢; 生长性能; 肠道菌群; 短链脂肪酸

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0212-09

Effects of *Clostridium butyricum* spores on growth performance, biochemical parameters in serum, intestinal flora and short-chain fatty acid content of *Penaeus vannamei*

YUAN Hailin¹, LI Xiangce¹, SUN Qiuxuan¹, TAN Xiaohong¹, SU Youlu¹, HUANG Yanhua¹, YIN Wenfei², ZHOU Meng¹

(1 College of Animal Science and Technology, Innovative Institute of Animal Healthy Breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering/Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding/Guangdong Provincial Water

Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510225, China;

2 Guangdong DZN Biotechnology Co., Ltd., Zhuhai 519000, China)

收稿日期: 2022-01-01 网络首发时间: 2022-12-26 09:57:46

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20221221.1834.001.html>

作者简介: 袁海林, 硕士, 主要从事水产动物营养与免疫相关研究, E-mail: 1723849266@qq.com; 通信作者: 周 萌, 副教授, 博士, 主要从事水产动物营养与免疫相关研究, E-mail: zhoumeng@zhku.edu.cn

基金项目: 广东省教育厅创新团队项目 (2020KCXTD019)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of feeding *Clostridium butyricum* (CB) spores on the growth performance, biochemical parameters in serum, intestinal flora composition and contents of five short-chain fatty acids of *Penaeus vannamei* juvenile. 【Method】 Basic diets were supplemented with CB spore product of 0, 0.050%, 0.075% and 0.100% mass fraction (The viable counts of bacteria in the diets were 0, 2.50×10^5 , 3.75×10^5 and 5.00×10^5 CFU/g respectively). The *P. vannamei* juveniles with (1.42 ± 0.02) g initial body weight of each were fed for 30 days, and growth performance, serum biochemical indicators, intestinal flora composition and short chain fatty acid contents were detected. 【Result】 Compared to the control group, the final body weights of the shrimps after 30 days feeding trial in the 0.050% and 0.075% CB groups significantly increased ($P<0.05$), and the weight gain rate significantly increased in the 0.050% CB group ($P<0.05$). The glucose concentration in serum of the 0.075% CB group and urea nitrogen concentration in serum of the 0.100% CB group significantly reduced ($P<0.05$), while the phosphorus concentration in serum of the 0.050% CB group significantly increased ($P<0.05$). Compared to the control group, the relative abundance of Planctomycetes and Patescibacteria significantly increased in the 0.050% CB group ($P<0.05$), while the relative abundance of *Vibrio* significantly reduced in the 0.050% and 0.075% CB groups ($P<0.05$). The diversity analysis indicated that the intestinal flora compositions were similar between the 0.050% and 0.075% CB groups, which were quite different from those of the control and 0.100% CB group. The intestinal contents of five short-chain fatty acids increased with dietary CB addition. 【Conclusion】 The supplementation of CB spore in diets helps to inhibit the proliferation of intestinal pathogens and increase the contents of intestinal short chain fatty acids, thus may enhance the nutrients utilization and growth performance of *P. vannamei* juvenile. In this study, the appropriate amount of *Clostridium butyricum* spore in diet is 2.50×10^5 or 3.75×10^5 CFU/g.

Key words: *Penaeus vannamei*; *Clostridium butyricum* spore; Growth performance; Intestinal flora; Short-chain fatty acid

凡纳滨对虾 *Penaeus vannamei* 为世界三大养殖虾类之一。自 1988 年引入中国以来,迄今已有 40 多年的养殖历史,2020 年全国养殖产量达到 186.3 万吨^[1]。然而,随着集约化养殖的加强,由于养殖密度过高、过度投喂以及饲料营养不均衡引发的肠道损伤问题频发,由此导致对虾消化吸收功能下降、免疫能力和生长受损,养殖成功率和养殖效益下降。因此,开发绿色、高效的对虾肠道保健产品,成为保障凡纳滨对虾健康养殖的当务之急。

丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* (CB) 属于芽孢杆菌科梭菌属,是一种专性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌。自 1933 年被发现、1935 年被分离及 1992 年引入我国以来,其促进肠道健康的效果已在多种水产养殖动物如罗非鱼^[2]、石斑鱼^[3]、鳗鲡^[4]、鲢鱼^[5]、鲤鱼^[6] 等中得到证实,其已知作用途径主要包括增强肠道黏膜屏障功能、调节宿主肠道菌群、调节肠道 pH,促进肠道对营养物质消化吸收等。丁酸梭菌于 2009 年被我国正式批准作为新饲料添加剂使用,在当前国家养殖减抗、饲料替抗(生素)的大背景下,其开发和应用将受到持续关注。

近年来的研究表明,饲用丁酸梭菌能改善克

氏原螯虾、罗氏沼虾、日本囊对虾的抗氧化功能,提高肠道消化酶活性,或改善肠道形态、调节肠道菌群结构^[7-9],说明丁酸梭菌在虾类饲料中也具有潜在的应用价值。但将丁酸梭菌作为肠道健康产品应用于凡纳滨对虾的研究还比较缺乏。有研究表明,在饲料中分别添加丁酸梭菌活菌、芽孢、破碎菌体或活菌与发酵上清混合物,均能提高凡纳对虾生长性能,且丁酸梭菌活菌和破碎菌体皆可提高凡纳对虾对副溶血弧菌的抵抗力,综合考虑生长性能、抗病力及产品保质期,丁酸梭菌芽孢更具有应用价值^[10-11]。为此,本研究拟选用一种丁酸梭菌芽孢制剂,研究其对凡纳滨对虾生长性能、血清生化指标、肠道菌群及肠道内短链脂肪酸含量的影响,为明确丁酸梭菌芽孢制剂在凡纳滨对虾中的应用效果及探讨其可能的作用途径提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验饲料配制

以进口鱼粉、小麦粉、去皮豆粕为主要蛋白源,精制鱼油为脂肪源,配制凡纳滨对虾基础饲料,基础饲料配方及其营养水平测定值如表 1 所示。丁酸

表 1 基础饲料配方及营养组成 (风干基础)

Table 1 Feed formulation and nutrient composition of the basal diet (air-dry basis)

项目 Item	成分 Ingredient	w/%
原料	鱼粉 Fish meal	36.0
Ingredient	小麦粉 Wheat flour	25.5
	去皮豆粕 Soybean meal	15.0
	花生粕 Peanut meal	8.0
	菜籽粕 Rapeseed meal	10.0
	鱼油 Fish oil	1.0
	大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.0
	磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5
	预混料 ¹⁾ Premix	2.0
	合计 Total	100.0
实测营养成分	粗蛋白 Crude protein	41.5
Measured nutrient	粗脂肪 Crude lipid	6.5
	粗灰分 Crude ash	9.5
	水分 Moisture	10.0

1)每千克预混料含有: VA 4 000 000 IU, VD₃ 1 500 000 IU, VE 100 000 IU, 硫酸素 10 g, 核黄素30 g, B₆ 30 g, 泛酸 60 g, 烟酸 80 g, B₁₂ 0.04 g, 生物素 0.2 g, 叶酸 6 g, 肌醇120 g, VC 150 g, MgSO₄·7H₂O 102.45 g, KI 0.08 g, ZnSO₄·7H₂O 4.05 g, MnSO₄·5H₂O 2.19 g, CoCl₂·6H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 16.55 g, Na₂SeO₄ 0.004 g, Ca(H₂PO₄)₂ 251.67 g

1)The premix per kilogram provides the following: VA 4 000 000 IU, VD₃ 1 500 000 IU, VE 100 000 IU, thiamine 10 g, riboflavin 30 g, B₆ 30 g, pantothenic acid 60 g, nicotinic acid 80 g, B₁₂ 0.04 g, biotin 0.2 g, folic acid 6 g, inositol 120 g, VC 150 g, MgSO₄·7H₂O 102.45 g, KI 0.08 g, ZnSO₄·7H₂O 4.05 g, MnSO₄·5H₂O 2.19 g, CoCl₂·6H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 16.55 g, Na₂SeO₄ 0.004 g, Ca(H₂PO₄)₂ 251.67 g

梭菌菌株 (DZNCB-1-105) 分离自土壤, 其芽孢制剂由广东大泽农生物科技有限公司提供, 粉状, 活菌数为 5×10⁸ CFU/g。分别将质量分数为 0(对照)、0.050%、0.075% 和 0.100% 的丁酸梭菌添加到基础饲料中, 即饲料中的活菌数分别为 0、2.50×10⁵、3.75×10⁵ 和 5.00×10⁵ CFU/g, 各处理简称为对照组 (CK)、0.050% CB 组、0.075% CB 组和 0.100% CB 组。和其他饲料原料充分混合均匀后, 用双螺杆挤压机制成直径为 1.5 mm 的 4 种试验饲料, 于 -20 ℃ 条件下保存。

1.2 试验动物与饲养管理

凡纳滨对虾购于广东省湛江市某对虾养殖场, 购回后放入广东恒兴集团“863”基地室内海水流水养殖系统中暂养 2 周, 暂养期间每日投喂基础饲

料 4 次。暂养期结束后, 挑选 480 尾大小均匀、健康的幼虾, 初始体质量为 (1.42±0.02) g, 将幼虾随机分成 4 组, 每组设 4 个重复, 每个重复 30 尾虾, 置于流水养殖系统的 350 L PVC 水族箱中。分别投喂 4 种试验饲料, 每日投喂 4 次 (07:00、11:30、16:00 和 20:30), 日投饲率 4%~6%, 每 3 d 根据虾的摄食情况调整投饲率。试验用水为经砂滤、臭氧消毒的天然海水, 水温(28±1) ℃, 盐度 (22±2)‰。通过不定期进水、排污及充氧, 保持溶氧为 (8.0±0.2) mg/L, 氨氮 (0.04±0.003) mg/L。养殖试验持续30 d。

1.3 样品采集与分析

1.3.1 生长性能 养殖试验结束时, 每个水族箱的虾称质量、计数, 统计饲料投喂量, 计算各处理组对虾的存活率、质量增加率和饲料系数。

存活率 = 收获尾数/放养尾数×100%,

质量增加率 = (末质量 - 初质量)/初质量×100%,

饲料系数 = 投喂量/(末质量 - 初质量)。

1.3.2 全虾及基础饲料的营养组成 每箱随机取 6 尾虾, 作为 1 个重复, 保存于 -20 ℃ 条件下用于检测全虾体成分。分别采用 105 ℃ 恒温干燥法、凯氏定氮法、索氏抽提法及 550 ℃ 灼烧法测定全虾及基础饲料的水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量。

1.3.3 血清生化指标 每箱随机取 9 尾虾, 使用 1 mL 注射器, 从围心腔抽取血淋巴, 4 ℃ 静置 2 h 后, 使用冷冻离心机 (Eppendorf, 5425R)10 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清。每 3 尾虾的血清混合成 1 个样品, 作为 1 个重复, 保存于 -80 ℃ 条件下待测, 每个处理 12 个重复。血清生化指标用全自动生化分析仪 (HITACHI, 7170 型) 根据专用试剂盒说明书进行检测。

1.3.4 肠道菌群组成 每箱随机取 6 尾虾, 在冰盘上取出肠道内容物, 混合后置于冻存管, 作为 1 个重复, 迅速保存于 -80 ℃ 条件下待测, 每个处理 4 个重复。用 DNA Kit(Omega Biotek) 试剂盒提取肠道细菌基因组 DNA。取合格样本 DNA 扩增 16S rDNA 序列的 V4 可变区。扩增引物为 515F(5'-GTGC-CAGCMGCCGCGG-3') 和 806R(5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3')。将 PCR 产物进行定量检测, 之后按照每个样品的测序量要求, 进行相应比例的混合, 构成测序样品文库。由 Illumina MiSeq 测序仪采用 MiSeq Reagent Kitv2(500-cycle) 完成测序。采用 Qiime 平台和 RDP classifier 2.2 软件对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 置信度阈值为 0.8, 并在各

个分类水平统计每个样品的群落组成。利用 Mothur 软件统计样品的 α 多样性,结果用 Sob、Chao、Ace、Shannon 以及 Simpson 多样性指数来表示。用 QIIME v1.80 软件统计分析样品的 β 多样性指数,采用主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 来进行数据统计分析,用 PCoA 散点图来表示不同处理之间的微生物群落物种组成的差异。

1.3.5 肠道内短链脂肪酸含量 每箱随机取 6 尾虾,在冰盘上取出虾肠道内容物,混合后置于 1.5 mL 无菌离心管中,作为 1 个重复,置于-80 ℃冰箱中保存,每个处理 4 个重复。取 0.1 g 样品于 2.0 mL 的 Ep 管中,加入 400 μ L 体积分数为 50% 的乙腈溶液、200 μ L 的 200 mmol/L 3-NPH 及 200 μ L 的 120 mmol/L EDC 溶液 (含体积分数为 6% 的吡啶) 涡旋 1 min 混匀,40 ℃ 反应 1 h,期间每隔 5 min 震荡 1 次;反应完成后 12 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min,取上清液上机进行 LC-MS/MS (美国 WATERS 的液相色谱 Waters Acquity UPLC、美国 SCIEX 的质谱 AB SCIEX 5500 QQQ-MS)。色谱分离条件:柱温 40 ℃,流速 0.30 mL/min;流动相组成: A 为水 (含 ϕ 为 0.1% 的甲酸), B 为乙腈 (含

ϕ 为 0.1% 的甲酸)。运行 8 min,进样量 6 μ L。质谱分析条件:电子轰击电离 (ESI 离子源),离子源温度 450 ℃,离子源气体 35 arb。选择离子检测 (SIM) 进行定量分析。按照上述色谱及质谱条件进样,利用 MultiQuant 软件进行积分,利用标准曲线进行相对浓度计算。

1.4 数据统计

用统计软件 SPSS 23.0 进行数据的分析统计,试验数据用平均数 $\pm$ 标准误表示。结果先进行单因子方差分析 (One-way ANOVA),再通过 Duncan's 多重比较分析数据之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 丁酸梭菌对凡纳滨对虾生长性能的影响

如表 2 所示,各组对虾的存活率为 96.66%~100.00%。其中,0.100% CB 组存活率达到 100.00%。与对照组相比,0.050% 和 0.075% CB 组对虾的末质量显著提高 ($P<0.05$);其中 0.050% CB 组质量增加率也显著提高。饲料系数在丁酸梭菌各添加组有下降趋势,但和对照组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。

表 2 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾生长性能的影响¹⁾
Table 2 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on growth performance of *Penaeus vannamei*

w(CB)/%	初质量/g Initial body weight	末质量/g Final body weight	存活率/% Survival rate	质量增加率/% Weight gain rate	饲料系数 Feed conversion rate
0(CK)	1.42 $\pm$ 0.00a	7.03 $\pm$ 0.14a	96.66 $\pm$ 3.85a	394.53 $\pm$ 9.51a	1.50 $\pm$ 0.04a
0.050	1.41 $\pm$ 0.00a	7.37 $\pm$ 0.08b	97.50 $\pm$ 1.67a	421.00 $\pm$ 5.31b	1.44 $\pm$ 0.04a
0.075	1.44 $\pm$ 0.03a	7.37 $\pm$ 0.03b	99.17 $\pm$ 1.67a	410.43 $\pm$ 8.65ab	1.45 $\pm$ 0.08a
0.100	1.42 $\pm$ 0.01a	7.31 $\pm$ 0.07ab	100.00 $\pm$ 0.00a	412.99 $\pm$ 5.84ab	1.43 $\pm$ 0.03a

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's method)

2.2 丁酸梭菌对凡纳滨对虾营养组成的影响

如表 3 所示,添加丁酸梭菌各组凡纳滨对虾的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分含量和对照组相比,均没有显著差异。

2.3 丁酸梭菌对凡纳滨对虾血清生化指标的影响

如表 4 所示,和对照组相比,0.075% CB 组对虾血清的葡萄糖浓度显著下降;该组胆固醇、甘油三酯浓度也低于其他各组,但没有统计学差异。随着丁酸梭菌添加量的升高,血清尿素氮浓度呈下降趋势,0.100% CB 组显著低于对照组;而添加丁酸梭菌提高了血清磷浓度,在 0.050% CB 组达到显著性水平。总蛋白浓度在各组之间

无显著差异。

2.4 丁酸梭菌对凡纳滨对虾肠道内容物菌群组成的影响

表 5 展示了各组丰度排名前 10 位的菌门。和对照组相比,丁酸梭菌各添加组浮霉菌门 Planctomycetes 的丰度显著升高,且在 0.075% CB 组达到最高;0.050% CB 组龋骨菌门 Patescibacteria 的丰度也显著高于对照组。其余各菌门的丰度在组间差异不显著。

在属水平,和对照相比,0.050% 和 0.075% CB 组弧菌属 *Vibrio* 丰度显著下降,假交替单孢菌属 *Pseudoalteromonas* 丰度有下降趋势;但后者在

表 3 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾营养组成的影响¹⁾

Table 3 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on nutrient compositions of *Penaeus vannamei* w/%

w(CB)/%	水分 Mositure	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	粗灰分 Crude ash
0(CK)	272.93±14.82a	70.57±0.80a	7.33±0.20a	12.87±0.99a
0.050	261.06±7.97a	70.63±0.12a	7.28±0.11a	12.73±0.23a
0.075	280.64±2.11a	70.24±0.37a	7.12±0.36a	13.10±0.60a
0.100	285.98±12.38a	70.56±0.18a	6.36±0.90a	13.60±0.67a

1)同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's method)

表 4 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾血清生化指标的影响¹⁾

Table 4 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on biochemical parameters in serum of *Penaeus vannamei*

w(CB)/%	c/(mmol·L ⁻¹)					总蛋白/ (U·L ⁻¹)
	葡萄糖 Glucose	胆固醇 Cholesterol	甘油三酯 Triglyceride	尿素氮 Urea nitrogen	磷 Phosphorus	Total protein
0(CK)	1.69±0.15b	2.21±0.23a	2.05±0.15a	1.23±0.17b	1.44±0.32a	64.38±3.13a
0.050	1.62±0.29ab	2.28±0.18a	2.09±0.16a	1.04±0.06ab	1.93±0.31b	66.43±2.94a
0.075	1.39±0.13a	1.83±0.18a	1.97±0.21a	1.11±0.14ab	1.79±0.24ab	66.53±3.83a
0.100	1.55±0.10ab	2.05±0.23a	2.03±0.19a	0.95±0.06a	1.80±0.26ab	65.47±3.72a

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's method)

表 5 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾肠道菌群组成 (门水平) 的影响¹⁾

Table 5 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on intestinal flora composition (phylum level) of *Penaeus vannamei*

w(CB)/%	变形菌门	拟杆菌门	疣微菌门	浮霉菌门	厚壁菌门
	Proteobacteria	Bacteroidetes	Verrucomicrobia	Planctomycetes	Firmicutes
0(CK)	43.9±3.9a	41.9±3.2a	6.8±1.3a	2.8±0.4a	1.5±0.8a
0.050	36.0±2.0a	46.3±1.7a	6.7±0.7a	5.7±0.6b	0.5±0.2a
0.075	36.5±1.5a	43.0±3.5a	8.1±1.8a	7.1±0.5b	0.4±0.1a
0.100	43.2±4.3a	42.4±3.5a	5.7±1.2a	4.6±0.8b	0.7±0.3a

w(CB)/%	放线菌	衣原体	髌骨菌门	埃普西隆杆菌门	柔膜菌门
	Actinobacteria	Chlamydiae	Patescibacteria	Epsilonbacteraeota	Tenericutes
0(CK)	1.1±0.1a	0.8±0.4a	0.4±0.0a	0.2±0.1a	0.2±0.0a
0.050	1.9±0.7a	1.3±0.2a	1.1±0.3b	0.0±0.0a	0.0±0.0a
0.075	2.1±1.1a	1.7±0.7a	0.5±0.1a	0.0±0.0a	0.1±0.0a
0.100	0.8±0.1a	1.1±0.6a	0.3±0.0a	0.0±0.0a	0.2±0.1a

1)同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's method)

0.100% CB 组丰度反而呈升高趋势。其余各属在组间差异不显著 (表 6)。

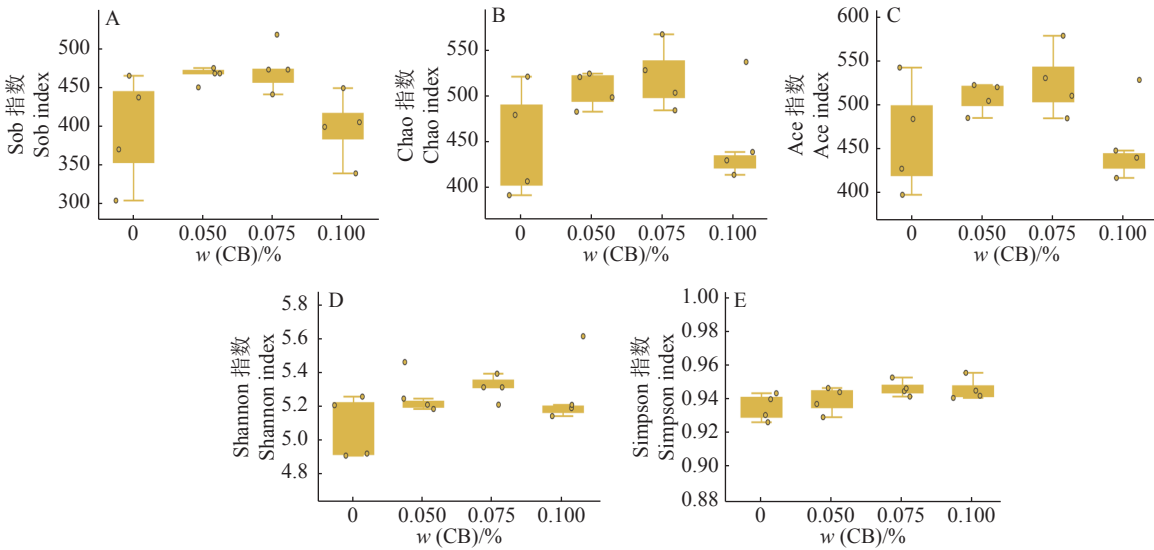
以 97% 序列相似度为阈值生成 OTU 后, 计算不同样品的 5 个 α 多样性指数, 并生成箱形图, 以分析样品的 α 多样性 (图 1)。结果表明, Sob、Chao、Ace 和 Shannon 多样性指数的变化趋势一致: 与对照组相比, 0.050% 和 0.075% CB 组对虾肠道菌群的 4 项指数较高; 当进一步将添加量提高到质量分数为 0.100% 时, 4 项指数数值均下降, 但各组之间差异不显著。Simpson 多样性指数亦在组间差异不显著。 β 多样性分析表明, 同一处理样品基本聚为一簇, 其中 0.050% 和 0.075% CB 组的样本

表 6 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾肠道菌群组成 (属水平) 的影响¹⁾
Table 6 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on intestinal flora composition (genus level) of *Penaeus vannamei*

w(CB)/%	弧菌属 <i>Vibrio</i>	<i>Motilimonas</i>	<i>Haloferula</i>	黏着杆菌属 <i>Tenacibaculum</i>	<i>Tamlana</i>
0(CK)	7.8±3.6b	6.4±1.9a	6.3±1.3a	5.9±0.8a	5.3±0.7a
0.050	1.2±0.3a	6.8±3.0a	6.2±0.8a	4.3±0.3a	7.6± 0.7a
0.075	1.1±0.2a	8.5±1.6a	7.7±1.8a	5.1±0.4a	6.1± 0.8a
0.100	3.8±2.5ab	6.4±1.0a	5.0±1.2a	4.1±0.7a	6.7±0.5a

w(CB)/%	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	<i>Hoppeia</i>	康氏菌属 <i>Kangiella</i>	<i>Halocynthiaibacter</i>
0(CK)	2.6±0.5ab	2.6±0.3a	2.5±0.8a	2.2±1.5a	1.6±0.5a
0.050	1.5±0.3a	3.4±0.5a	4.1±0.4a	2.0±0.5a	1.1±0.3a
0.075	2.3±0.4a	4.1±0.9a	3.9±0.8a	0.8±0.2a	1.6±0.3a
0.100	3.7±0.6b	2.5±0.5a	4.7±2.1a	1.3±0.6a	1.4±0.1a

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's method)



图中空心圆点为各样本点
The hollow dots in the figures represent individual samples

图 1 基于 5 种多样性指数分析的 α 多样性箱形图

Fig. 1 The α diversity box plot based on analysis of five diversity indexes

距离较接近, 而对照组和 0.100% CB 组与其他 2 组样本的距离较远, 表明 0.050% 和 0.075% CB 组物种组成较相似 (图 2)。

2.5 丁酸梭菌对凡纳滨对虾肠道内短链脂肪酸含量的影响

随着丁酸梭菌添加量的升高, 对虾肠道内 5 种短链脂肪酸的含量均有不同程度的升高 (表 7)。和对照组相比, 乙酸含量在 0.050%、0.075% 和 0.100% CB 组分别升高了 31.4%、98.1% 和 182.5%; 丙酸含量升高了 6.7%、40.0% 和 266.7%; 丁酸含量升高了 -10.0%、65.0% 和 60.0%; 戊酸含量升高了 9.7%、95.6% 和 140.7%, 己酸含量升高了 5.7%、68.6% 和 117.1%。可见, 饲料中添加丁酸梭菌总体上大幅增加了肠内 5 种短链脂肪酸的含量。

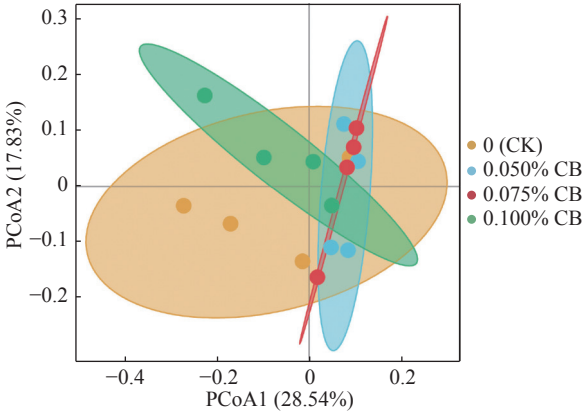


图 2 基于主坐标分析 (PCoA) 的各丁酸梭菌 (CB) 添加组肠道菌群组成散点图

Fig. 2 Scatter plot of intestinal flora composition in groups added with different amounts of *Clostridium butyricum* (CB) based on principal coordinates analysis (PCoA)

表 7 饲料中添加丁酸梭菌 (CB) 对凡纳滨对虾肠道内短链脂肪酸含量的影响¹⁾

Table 7 Effects of dietary *Clostridium butyricum* (CB) on intestinal short-chain fatty acid contents of *Penaeus vannamei* w/(mg·g⁻¹)

w(CB)/%	乙酸 Acetic acid	丙酸 Propanoic acid	丁酸 Butyric acid	戊酸 Pentanoic acid	己酸 Hexanoic acid
0(CK)	5.32±0.31a	0.30±0.04a	0.20±0.00a	1.13±0.02a	0.35±0.00a
0.050	6.99±0.24b	0.32±0.03a	0.18±0.01a	1.24±0.07a	0.37±0.01a
0.075	10.54±0.61c	0.42±0.03a	0.33±0.00b	2.21±0.14b	0.59±0.01b
0.100	15.03±0.31d	1.10±0.08b	0.32±0.01b	2.72±0.11c	0.76±0.01b

1)同列数据后的不同小写字母表示差异显著(P<0.05, Duncan’s 法)
1) Different lowercase letters of the same column indicate significant differences (P<0.05, Duncan’s method)

3 讨论与结论

3.1 丁酸梭菌对生长性能的影响

丁酸梭菌对动物的促生长作用与其生物学特性密切相关。该菌属厌氧芽孢杆菌,在不良环境胁迫下能以孢子形式存在,具有更强的耐酸、耐胆盐特性,能够很好地在肠道定植而发挥作用。研究表明,丁酸梭菌能提高罗氏沼虾^[12]、日本沼虾^[13]和斑节对虾^[14]等的生长性能,本研究中适宜数量的丁酸梭菌显著提高了凡纳滨对虾的生长性能,进一步表明虾等无脊椎动物也可有效利用饲料中的丁酸梭菌,提高生长性能。

3.2 丁酸梭菌对血清生化指标的影响

血清生化指标可以反映出机体能量代谢和营养物质吸收能力。血清总蛋白和白蛋白含量的升高是机体蛋白质代谢旺盛的体现^[15],尿素氮是衡量动物体内蛋白质代谢和氨基酸平衡的一个重要指标,血清尿素氮的降低通常伴随着蛋白质沉积的升高^[16]。在猪和肉鸡中的研究表明,饲料中添加丁酸梭菌可以显著降低两者血清尿素氮的浓度,并显著提高血清总蛋白、白蛋白和球蛋白的浓度^[16-17]。本研究也发现,添加丁酸梭菌可显著降低对虾血清尿素氮浓度,0.050%和0.075%CB组的总蛋白浓度也有升高趋势;同时,还观察到血清磷浓度的显著升高。这可能是因为进入肠道的丁酸梭菌在肠道产生的短链脂肪酸促使肠道酸度增加,从而有利于某些有益菌的生长繁殖,增强消化酶活性,提高营养物质尤其是蛋白质及矿物元素的消化率^[16]。血糖水平在一定程度上可以反映机体的合成代谢情况。本研究发现,饲料中添加质量分数为0.075%的丁酸梭菌显著降低了对虾血糖水平。类似的研究包括,丁酸梭菌可以降低糖尿病小鼠的空腹血糖,改善糖尿病及相关代谢紊乱^[18];饲料中添加丁酸梭菌可降低猪对感染大肠埃希菌的应激反应,降低血糖水平^[19]。

但也有研究表明,饲料中添加丁酸梭菌能提高犊牛的生长性能和血清葡萄糖含量^[20]。有关丁酸梭菌调节动物糖代谢的机制及效果,还需要更多的研究数据支持。

3.3 丁酸梭菌对肠道菌群的影响

本研究中,凡纳滨对虾肠道第一、二优势菌分别是变形菌门和拟杆菌门,它们也是大多数研究中对虾肠道的常见优势菌^[21-22],丰度并未受饲料中丁酸梭菌的影响,表明它们可能是对虾体内稳定的“核心菌群”^[23]。和对照组相比,添加3种不同质量分数的丁酸梭菌均显著提高了对虾肠道内浮霉菌门的丰度。浮霉菌门的成员在水生系统中普遍存在,包含多种厌氧氨氧化细菌,是高氨污染系统脱氮的生态友好型微生物^[24]。郁维娜等^[25]的研究显示,健康凡纳滨对虾肠道中浮霉菌门丰度显著高于患病虾,表明浮霉菌门的增殖有利于提高对虾的健康水平。同时,饲料中添加质量分数为0.050%和0.075%的丁酸梭菌降低了对虾肠道弧菌属的丰度,对假交替单胞菌属的丰度有降低的趋势。弧菌属中的很多种类是水产养殖业中常见的病原菌,其在肠道以及水体中丰度的升高常被视为虾类弧菌病暴发的前奏^[26]。Sumon等^[27]的研究表明,丁酸梭菌可以抑制罗氏沼虾肠道内弧菌的生长;宋增福等^[28]使用肠细胞模型评估丁酸梭菌对鳗弧菌黏附能力的拮抗作用,发现丁酸梭菌有效抑制鳗弧菌对鱼类肠道的黏附。假交替单胞菌是一种能产生多种胞外活性物质的海洋细菌属,为对虾养殖环境中的常见致病菌,有研究证实其具有较强的致病能力,并且其在患病凡纳滨对虾中的丰度显著高于健康组^[25]。可见,添加丁酸梭菌能降低肠道中这些潜在病原菌的丰度,这可能与丁酸梭菌能够通过改善肠道屏障功能来降低病原菌的入侵和定植,以及其含有的脂磷壁酸等益生成分抑制了病原菌对肠道细胞的黏附作用,或其代谢产物如短链脂肪酸的抑菌作用有

关^[29-30]。在本研究中,发现梭菌属并非肠道内容物的优势菌,推测丁酸梭菌对于肠道上皮细胞具有高黏附作用,大部分可定植在肠壁,而非直接进入肠腔,但需要通过细菌定植试验进一步证实。

3.4 丁酸梭菌对肠道短链脂肪酸的影响

丁酸梭菌可在动物肠道发酵,产生以丁酸为主的短链脂肪酸,它们对动物肠道的能量供应、肠黏膜屏障的维持、肠道高敏感和肠道动力的调节、免疫调节等具有重要作用^[31]。本研究发现,随着丁酸梭菌添加量的升高,凡纳滨对虾肠道内容物中 5 种短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸)的含量均显著升高,这与 Duan 等^[9]在日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 中的研究结果一致。不同种类的短链脂肪酸或其衍生物对提高水产动物生长性能、调节营养代谢的作用也在多项研究中得到证实。如饲料中添加丙酸钠可增加凡纳滨对虾对能量和磷的表观消化率,调节其肠道微生物并促进凡纳滨对虾生长^[32];在饲料中添加丁酸盐能够显著提高商业虾采食量,改善其生长^[33];添加 3%(w) 的 β-羟基丁酸可改善凡纳滨对虾的生长性能、肠道消化酶活性及免疫水平,并增加其肠道短链脂肪酸含量^[34];在蓝蟹 *Salvelinus alpinus* 饲料中分别添加乙酸钠、柠檬酸钠、丁酸钠或 2%(w) 丙酸钠等有机酸,均能够促进蓝蟹生长,促进其蜕皮,并提高其存活率^[35]。目前关于戊酸对水产动物肠道健康的影响研究甚少,但研究发现,饲料中添加戊酸酯可降低小鼠肠道艰难梭菌的存活数^[36],且肠道菌群代谢产生的戊酸可防止小鼠的辐射损伤^[37]。然而,本研究中也观察到,添加丁酸梭菌至 0.100%(w) 时,尽管肠道短链脂肪酸含量进一步升高,但对虾的生长性能指标并未继续升高,且肠道菌群组成和 0.050% 及 0.075% CB 组相比,发生了较大变化,表明短链脂肪酸的过量产生可能会使肠道 pH 过低,导致肠道发生酸胁迫,从而破坏肠道菌群平衡^[38],影响对虾的生长性能。

综上,本研究证实,饲料中添加丁酸梭菌芽孢制剂可抑制肠道潜在病原菌的丰度、提高肠道短链脂肪酸的含量,改善肠道健康水平,从而改善营养物质的利用,提高凡纳滨对虾的生长性能。本试验条件下,丁酸梭菌芽孢制剂在饲料中的适宜添加剂量为 2.50×10⁵ 或 3.75×10⁵ CFU/g。

参考文献:

[1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.

[2] POOLSAWAT L, LI X, 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*, 2019, 26(3): 657-670.

[3] HE R P, FENG J, TIAN X L, et al. Effects of dietary supplementation of probiotics on the growth, activities of digestive and non-specific immune enzymes in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(12): 5782-5790.

[4] 兰菲菲. 饲料中添加丁酸梭菌对鳗鲡生长与健康的促进作用[D]. 厦门: 集美大学, 2019.

[5] 潘晓东, 吴天星, 宋增福, 等. 丁酸梭菌对鲢鱼肠粘膜结构及肠内短链脂肪酸的影响[C]//中国畜牧兽医学会, 中国畜牧兽医学会. 第四届第十次全国学术研讨会暨动物微生态企业发展战略论坛论文集(上册). 2010: 147-151.

[6] 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.

[7] 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.

[8] WANGARI M R, GAO Q, SUN C, 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*, 2020, 52(1): 12-22.

[9] 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.

[10] LI H D, TIAN X L, ZHAO K, et al. Effect of *Clostridium butyricum* in different forms on growth performance, disease resistance, expression of genes involved in immune responses and mTOR signaling pathway of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 87: 13-21.

[11] LUO K, TIAN X L, WANG B, et al. Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737041.

[12] 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.

[13] DUAN Y F, ZHANG Y, DONG H B, et al. Effect of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on growth, intestine antioxidant capacity and resistance to high temperature stress in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 66: 93-

- 100.
- [14] DUAN Y F, ZHANG J S, HUANG J, 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.
- [15] 周建民, 付宇, 王伟唯, 等. 饲料添加果寡糖对产蛋后期蛋鸡生产性能、营养素利用率、血清生化指标和肠道形态结构的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(4): 1806-1815.
- [16] 杨玲, 欧阳富龙, 袁旭鹏, 等. 饲料中添加复合益生菌对断奶仔猪生长性能、粪便微生物及血液生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2018(11): 49-54.
- [17] 贾聰慧, 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.
- [18] 贾玲玲. 丁酸梭状芽孢杆菌 CGMCC0313.1 改善糖尿病及相关代谢紊乱[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [19] 邢帅, 朱琪, 梁东梅, 等. 丁酸梭菌缓解仔猪应激防御大肠杆菌病[J]. 中国饲料, 2018(7): 54-58.
- [20] 何家俊, 吴汉葵, 杨听润, 等. 丁酸梭菌对犊牛生长性能和血清生化、抗氧化、免疫指标及粪便微生物数量的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(9): 5076-5085.
- [21] 夏雨, 范荣波, 易华西, 等. 植物乳杆菌对凡纳滨对虾致病菌抑制及其对肠道菌群结构的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(10): 37-46.
- [22] HUANG Z B, LI X Y, WANG L P, et al. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Research, 2014, 47(6): 1737-1746.
- [23] 张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 饲料添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll 受体及溶菌酶基因表达及抗感染的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 846-854.
- [24] DELMONT T O, QUINCE C, SHAIER A, et al. Nitrogen-fixing populations of Planctomycetes and Proteobacteria are abundant in surface ocean metagenomes[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(7): 804-813.
- [25] 郁维娜, 戴文芳, 陶震, 等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 399-409.
- [26] XIONG J B, WANG K, WU J F, et al. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(16): 6911-6919.
- [27] SUMON M S, AHMED F, KHUSHI S S, et al. Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets[J]. Journal of King Saud University-Science, 2018, 30(1): 21-28.
- [28] 宋增福, 吴天星, 潘晓东. 丁酸梭菌对肠道上皮细胞黏附及对鳃弧菌抑制的研究[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(8): 9-12.
- [29] ZHOU Z G, LIU Y C, HE S X, et al. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂)[J]. Aquaculture, 2009, 291(1/2): 89-94.
- [30] GAO Q, XIAO C, MIN M, et al. Effects of probiotics dietary supplementation on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of silver pomfret, *Pampus argenteus*[J]. Indian Journal of Animal Research, 2016, 50: 936-941.
- [31] 薛永强, 张辉华, 王达, 等. 短链脂肪酸对肠道健康的调控机制及在动物生产中的应用[J]. 饲料工业, 2020, 41(19): 18-22.
- [32] SILVA B C D, VIEIRA F D N, MOURINO J L P, et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Research, 2016, 47: 612-623.
- [33] SILVA B C, NOLASCO-SORIA H, MAGALLON-BARAJAS F, et al. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements[J]. Aquaculture Nutrition, 2016, 22(5): 997-1005.
- [34] DUAN Y F, ZHANG Y, DONG H B, et al. Effect of dietary poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on growth performance, intestinal health status and body composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 60: 520-528.
- [35] RINGER E. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)[J]. Aquaculture, 1991, 96: 321-333.
- [36] MCDONALD J A K, MULLISH B H, PECHLIVANIS A, et al. Inhibiting growth of *Clostridioides difficile* by restoring valerate, produced by the intestinal microbiota[J]. Gastroenterology, 2018, 155(5): 1495-1507.
- [37] LI Y, DONG J L, XIAO H W, et al. Gut commensal derived-valeric acid protects against radiation injuries[J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 789-806.
- [38] 李芳源, 王常安, 刘红柏. 丁酸梭菌对水产动物营养及免疫研究进展[J]. 水产学杂志, 2021, 34(5): 104-110.