

# 丁酸梭菌对加州鲈生长性能、肠道免疫健康及微生物区系的影响

潘思竹1,2,王熙涛1,2,\*,权春善1,2,\*



1 大连民族大学生命科学学院,生物技术与生物资源利用教育部重点实验室,中国大连 2 大连民族大学生命科学学院生物工程系,中国辽宁省大连市 通信作者:王熙涛、权春善(电子邮箱: mikyeken@dlnu.edu.cn)

介绍

● 加州鲈是全球广泛养殖的高价值经济淡水鱼,自20世纪末引入中国后,凭借刺少味美、易养殖、生长周期 短的优势,迅速成为国内淡水养殖的主力品种,市场需求与养殖规模持续扩大。当前其养殖以集约化模式为主, 但高密度养殖易引发水质恶化、鱼体免疫力下降等问题,进而导致病害频发;抗生素的大量使用虽能短期控制 病害,却会引发鱼体耐药性、水产品药物残留等隐患,间接威胁人类健康,因此寻找安全高效的抗生素替代品 迫在眉睫。丁酸梭菌是鱼类肠道内的常见共生菌,可产生丁酸、消化酶及细菌素等多种有益代谢物,其益生价 值已在多领域得到证实: 在水产养殖中,对黄鲶鱼、罗非鱼、鲤鱼等鱼类能显著提升生长速率、优化肠道结构、 增强免疫防御能力。但目前关于丁酸梭菌的研究多集中于家禽、哺乳动物及部分鱼类,针对加州鲈生理机能与 养殖需求的专项研究十分有限。本研究将丁酸梭菌作为饲料添加剂,系统探究其对加州鲈生长性能、肠道组织 结构及免疫调控指标的具体影响,为其在加州鲈健康养殖中的科学应用提供有力依据。

## 材料与方法

实验先从3株实验室保藏丁酸梭菌(DMZ-SG06、CBA、CBB)中筛选优势株:经 TSC、RCM 培养 基厌氧培养后,测 ODcod值绘生长曲线,气相色谱检测产酸量,结合不同温度保存后的存活率,确定 DMZ-SG06 为目标菌株,进一步验证其耐酸、耐胆盐特性及菌粉稳定性,并完成基因组测序与形态观察。制备试 验日粮: DMZ-SG06 制成发酵液 (5×10\* cfu/mL) 和冻干粉 (5×10\* cfu/g) , 设 Con 组 (基础饲料) 、T1 组 (每 10g 饲料加 1g 菌粉)、T2 组 (每 10g 饲料加 1mL 菌液。选取 90 尾健康加州鲈幼鱼每组 30 尾,在 养殖箱中饲养 60d, 日均投喂 2 次并记录摄食量。饲养结束后,禁食 24h 麻醉鱼体,测增重率、特定生长 率等生长指标;采集血清测抗氧化与免疫指标,解剖取肠道,用于形态观察(H&E 染色)和炎症基因RTqPCR和 Elisa 检测, 另取肠道内容物进行宏基因组测序分析菌群结构与功能。数据用 SPSS 26.0 统计 (P<0.05 为显著), GraphPad Prism 10 绘图。

# 结果

#### 全基因组测序

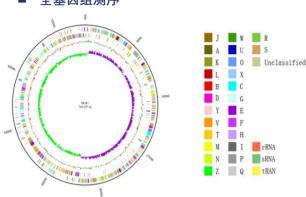


图1 丁酸梭菌DMZ-SG06全基因组测序图 长度约为4.7Mbp, 其中染色体概况如图所示, 拓扑结构为环状, 序列长度为 3921320bp, GC含量为28.82%, 基因数目为4278个, 基因长 度占比为83.93%。

### ■ 生长性能及水产养殖指标

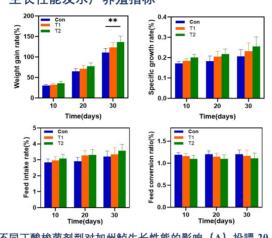


图3 不同丁酸梭菌剂型对加州鲈生长性能的影响(A)投喂 20 天、40 天、60 天时的增重率 (B) 各组的特定生长率 (C) 各组的摄食率 (D) 各组的饲料转化率

# 全基因组功能分析图

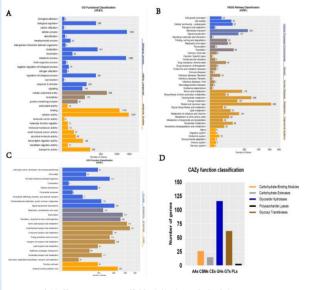


图2 丁酸梭菌DMZ-SG06菌株功能注释分类分析图 (A) KEGG 通路 (B) GO (C) COG (D) CAZv

#### 宏基因组肠道区系变化

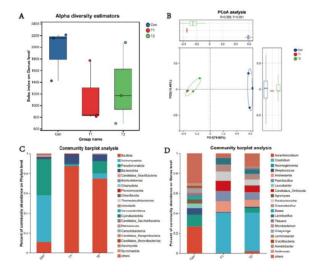


图 4 丁酸梭菌对大口黑鲈肠道菌群的影响 (A)a 多样性: Sobs 指数 (B) β 多样性 (PCoA) (C) 门水平肠道区系变化图 (D) 属水平肠道 区系变化图

# RT-qPCR实验

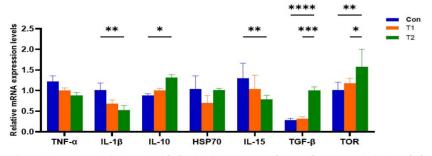


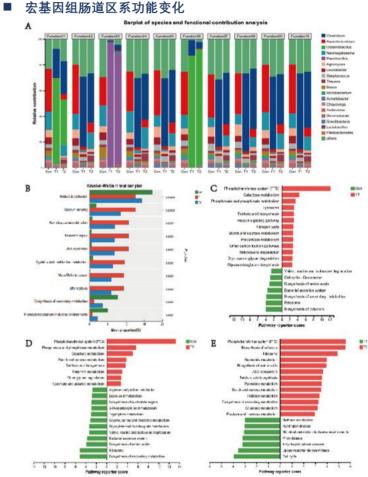
图5 不同组加州鲈中相关细胞因子的 mRNA 表达水平比较(A)肿瘤坏死因子 -α(TNF-α)mRNA 表达水平(B)白细胞介素 - 1β (IL-1β) mRNA 表达水平 (C) 白细胞介素 - 15 (IL-15) mRNA 表达水平 (D) 白细胞介素 - 10 (IL-10) mRNA 表达水平 (E) 热 休克蛋白 70 (HSP70) mRNA 表达水平 (F) 转化生长因子 -β (TGF-β) mRNA 表达水平 (G) 雷帕霉素靶蛋白 (TOR) mRNA 表 达水平

### ELISA 实验

Item	Con	T1	T2
TNF-α, pg/g	178.67±7.80°	150.52±9.91ª	128.57±4.97b
IL-1 $\beta$ , pg/g	260.08±8.61ª	$213.62 \pm 12.22^{b}$	$166.55 \pm 10.87^{\circ}$
IL-10, pg/g	$244.31 \pm 7.57^{a}$	$306.87 \pm 13.50^{b}$	$321.89 \pm 15.03^{b}$

图6 不同组间肿瘤坏死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 、白细胞介素 - $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 及白细胞介素 -10 (IL-10) 水平比较

### 宏基因组肠道区系功能变化



肠道菌群功能的 KEGG 数据库分析(A) 物种与功能贡献度分析条形图(B) Kruskal-Wallis H 检 T1 组与 Con 组的通路报告得分: T1 组 60% 以上功能通路富集程度上调,如磷酸转 (PTS)、半乳糖代谢、膦酸盐和次膦酸盐代谢等通路。(D) T2 组与 Con 组的通路报告 得分: T2 组磷酸转移酶系统 (PTS)、半乳糖代谢等通路仍高度富集。(E) T1 组与 T2 组的通路 报告得分: T2 组 PTS、半乳糖代谢等通路得分高于 T1 组。

### H&E染色肠道形态图

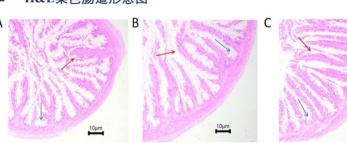


图8 不同组结肠组织形态学观察(A) 空白对照组:结肠黏膜层绒毛短而稀疏,部分绒毛顶端融合、 萎缩(红色箭头),隐窝深度较浅(蓝色箭头),固有层可见散在炎症细胞浸润。(B) 菌粉形式丁 酸梭菌组:绒毛长度显著增加,排列较整齐,隐窝深度略有加深,炎症细胞数量减少。(C)菌液形 式丁酸梭菌组: 绒毛高度及密度接近正常生理状态,隐窝深度显著大于对照组,固有层炎症细胞

# 结论

本研究筛选出一株具有产酸能力强、稳定性好、基因组安全性高 的丁酸梭菌DMZ-SG06菌株,并将其制成菌粉与菌液两种形式用作饲料添 加剂,研究其对加州鲈生长性能、肠道结构、免疫调控及肠道菌群区系的 效果。研究显示在饲喂加州鲈以丁酸梭菌DMZ-SG06两种形式的日粮后, 显著提升了加州鲈增重率、显著改善了肠道形态、显著增强了非特异性免 疫、显著调节了肠道免疫因子的表达水平和肠道菌群的结构及功能,且菌 液组效果优于菌粉组,推测是由于菌液形式组含有丁酸梭菌DMZ-SG06代 谢产物丁酸,它可以与丁酸梭菌菌体协同发挥作用,而菌粉组由于其生产 工艺仅含丁酸梭菌菌体。本研究表明丁酸梭菌作为新一代绿色水产饲料添 加剂展现出对加州鲈健康养殖的巨大潜力,为后续研究复合菌剂及对其他 鱼类的作用提供了理论依据。