

[编者按]丁酸梭菌是一种专性厌氧、革兰氏阳性产芽孢的杆菌,不水解明胶、不消化血清蛋白,能够发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖等碳水化合物产酸,能产生淀粉酶,水解淀粉但不水解纤维素。丁酸梭菌发酵淀粉和糖类的最终代谢产物为丁酸、醋酸和乳酸,还有少量的丙酸、甲酸,产生的有机酸能抑制肠道有害菌,能促进肠道双歧杆菌和乳杆菌的生长。此外,还具有耐酸、耐热、耐盐、抗逆性、易保存的特点,是一种应用广阔的饲料添加剂。水产配合饲料中添加丁酸梭菌,可促进水产动物生长,调节肠道菌群生态平衡,增强机体免疫功能,保障水产动物机体健康。本期我们特邀厦门大学海洋与地球学院艾春香教授以“丁酸梭菌的研发及其在水产配合饲料中的应用”为题,详细介绍了丁酸梭菌的研发及在水产配合饲料中的应用,供大家参考。

丁酸梭菌的研发及其在水产配合饲料中的应用

■ 艾春香

(厦门大学海洋与地球学院,福建厦门 361005)

摘要:丁酸梭菌为专性厌氧产芽孢的革兰氏阳性益生菌,具有耐热、耐酸和耐受多种抗生素等特点,是一种应用前景广阔的饲料添加剂。水产配合饲料中添加丁酸梭菌,可促进水产动物生长,调节肠道菌群微生态平衡,修复肠道损伤,增强机体免疫功能,保障水产动物机体健康,减少疾病发生,减少抗生素等药物的使用,进而减少水产品中的药物残留以及环境中的抗生素残留。本文简要概述了丁酸梭菌的研发及其在水产配合饲料中的应用,旨在为丁酸梭菌产业的健康发展及其在水产养殖绿色生产中的应用提供参考。

关键词:丁酸梭菌;研发;水产配合饲料;应用;水产动物

doi:10.13302/j.cnki.fi.2018.24.001

中图分类号:S816.8

文献标识码:A

文章编号:1001-991X(2018)24-0001-07

Research & development of *Clostridium butyricum* and its application in aquatic formula feed

Ai Chunxiang

Abstract: *Clostridium butyricum* is a gram-positive, obligate anaerobic and endospore-forming probiotic, which is a kind of promising feed additive with the characteristics of heat resistance, acid resistance, tolerance to various antibiotics. *C. butyricum* could promote the growth of aquatic animals, regulate the microecological balance of intestinal flora, repair the intestine epithelium, enhance the body's immune function, guarantee the health of aquatic animals, reduce the occurrence of aquatic animals diseases, reduce the use of antibiotics and other drugs, and thereby reduce drug residues in aquatic products and antibiotics in the aquaculture environment. The present review

summarizes and discusses the research and development of *C. butyricum* and its application in aquaculture formula feed, aiming at providing reference for the healthy development of *C. butyricum* industry and its application in sustainable aquaculture.

Key words: *Clostridium butyricum*; research & development; aquatic formula feed; application; aquatic animals

作者简介:艾春香,博士,研究方向为水产动物营养与饲料教学科研。

收稿日期:2018-11-13

基金项目:厦门南方海洋研究中心海洋产业核心和关键技术攻关项目“高效饲用海洋动物源益生菌的产业化开发及应用示范”[NO.17GZP007NF03];国家自然科学基金项目“拟穴青蟹糖代谢调控与利用的生理与分子机制”[NO.31572624]

我国是世界上水产养殖大国,自1989年以来已连续28年水产品总产量位居世界首位,而且呈现持续健康发展态势。2017年全国水产品总产量6 445.33万吨,其中养殖产量4 905.99万吨,占总产量的76.12%,捕捞产量1 539.34万吨,占总产量的23.88%(2018年中国渔业统计年鉴)。在食品安全和环保压力不断加大的新时代,转变水产养殖生产方式,推进水产养殖绿色生产是当下水产业持续发展的基本要求。采用绿色生产技术,营造良好的水产养殖环境,增强水产动物的自身免疫力,科学规范使用抗生素,规避抗生素使用隐患,防止耐药菌产生,以保障水产品安全和水产养殖环境不被抗生素污染。我国极为重视抗生素的科学使用问题,水产养殖端限抗减抗也已经提到议事日程,乱用抗生素,不仅仅是违规的问题,严重的涉及到刑法的制裁。为了加强兽用抗菌药物管理,遏制动物源细菌耐药,保障养殖业生产安全、食品安全、公共卫生安全和生态安全,促进养殖业绿色发展,维护人民群众身体健康,促进经济生态社会持续健康发展,2017年6月23日农业部印发的《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017~2020年)》和2018年4月20日农业农村部办公厅发布了《关于开展兽用抗菌药使用减量化行动试点工作的通知》,通知指出,推进兽用抗生素药物减量化使用,实施“退出行动”,推动促生长抗菌药物逐步退出以及将大刀阔斧地淘汰100多种高风险的兽药产品。基于食品安全、环保压力,我国实施的限抗减抗行动和水产养殖绿色生产发展方式转变,抗生素替代产品开发与应用迎来了春天,益生菌类、酸化剂、酶制剂类、缓释中链脂肪酸类和中草药及其提取物等抗生素绿色替代产品的开发前景广阔,其中益生菌类产品因绿色环保、无毒副作用、无残留、作用范围广、不产生耐药性等优点逐渐成为最具潜力的抗生素替代品(王亚敏等,2008;陈树河等,2016;钱怡等,2018;Das等,2017;Dawood等,2018;Hoseinifar等,2018;Sayes等,2018)。1933年,日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报道了丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)。1992年,我国由黑龙江省科学院微生物研究所从俄罗斯微生物研究所引进丁酸梭菌,从此在中国定植。2003年欧盟批准丁酸梭菌用作肉鸡和断奶仔猪的饲料添加剂,2009年7月我国农业部批准了新饲料添加剂——丁酸梭菌的生产

及使用,并于2013年12月其纳入《饲料添加剂品种目录(2013)》的附录二中(赵敏孟等,2018;梁静等,2018;徐亚飞等,2018)。随着丁酸梭菌科技界和产业界的科研人员对其研发的不断深入及水产养殖绿色生产的需求,其在水产配合饲料中的应用研究工作引起了人们的重视,并已取得一定的成效。本文概述了丁酸梭菌的研发及其在水产配合饲料中的应用,以期今后相关研发工作积累资料。

1 丁酸梭菌的生物学特性及其生理功能

1.1 丁酸梭菌的生物学特性

丁酸梭菌(*C. butyricum*),又名酪酸菌、丁酸梭状芽孢杆菌、丁酸菌、宫入菌,概称为“可产生芽孢的乳酸菌”,隶属于硬壁菌门(Firmicutes),梭菌纲(Clostridia),梭菌目(Clostridiales),梭菌科(Clostridiaceae),梭菌属(*Clostridium*),为专性厌氧的G⁺芽孢杆状菌,其细胞壁含D,L-二氨基庚二酸和葡萄糖,周身鞭毛,可运动,偶见丝状菌体,芽孢卵圆,偏心或次端生。丁酸梭菌呈直杆状或稍有弯曲,在液体培养基中培养,丁酸梭菌产生大量的气体,后期沉淀较多。在琼脂平板上形成白色或灰白色或奶油色或乳黄色的不规则圆形菌落,呈煎蛋样,中间隆起,表面湿润光滑,不透明,略有酸臭味。丁酸梭菌的适宜生长繁殖温度为25~37℃,在自然界中主要存在于奶酪、天然酸奶、人与动物粪便及土壤中,能产生芽孢,可抵抗不良环境(赵敏孟等,2018;梁静等,2018;徐亚飞等,2018)。

丁酸梭菌具有耐热、耐酸和耐胆汁等生物学特性。研究表明,丁酸梭菌经80℃、30 min,90℃、10 min热处理后98%存活;加热90℃、20 min后95%存活;加热100℃、5 min后80%存活。这些特性使得丁酸梭菌成为一种适合在水产配合饲料中添加且能被水产动物有效利用的、抗逆性强的益生菌。此外,丁酸梭菌能耐较强酸性并耐胃酸和胆汁酸,能耐pH值1.0~5.0,最适pH值4.0~9.8。

丁酸梭菌能够促进多种碳水化合物发酵生成丁酸、乳酸、乙酸等短链脂肪酸,并产生B族维生素、维生素K等生物活性物质,还可产生淀粉酶、蛋白酶、糖苷酶、纤维素酶、磷脂合成酶和脂肪酶等,这有助于补充水产动物营养物质,提高水产动物对饲料的消化吸收率。

丁酸梭菌的代谢产物——丁酸能够刺激肠黏

膜细胞的增殖,使得其只黏附于水产动物肠道细胞而不损伤细胞,它还能与双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、乳酸菌(*Lactobacillus sp*)、粪杆菌(*Coprophil bacteria*)等水产动物肠道有益菌共生,并促进其发育,调节肠道微生态平衡等。它作为益生菌既可以单独使用,也可以和多种菌种合用(Kong等,2009)。

目前研究发现,丁酸梭菌仅对新生霉素、先锋霉素、万古霉素和四环素等少数几种抗生素敏感,对多种抗生素(β -内酰胺类、大环内酯类、喹诺酮类等)具有较强的耐受性,与这些抗生素配合使用时其生物活性不受影响,而且还能加强治疗效果,无毒副作用(Kong等,2009)。

1.2 丁酸梭菌的生理功能

1.2.1 抑制有害细菌的繁殖,促进“土著”有益菌的繁殖,调节肠道微生态平衡

丁酸梭菌作为动物肠道内的“土著菌”,可以很好地在肠道中定植,并有效地防止病原菌及腐败菌在肠道内的异常增殖,促进肠道有益菌群增殖、发育,从而纠正肠道菌群紊乱,减少肠毒素的产生。体外实验发现,丁酸梭菌可以有效抑制鱼肠道致病菌鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),并且效果优于硫酸链霉素;尤其是已经对硫酸链霉素产生耐药性的菌株,效果更为显著;体内实验也发现,在鳊鱼(*Miichthys miiuy*)肠道丁酸梭菌可以有效抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)的增长,明显提高了假单胞菌在好氧菌结构中的相对比例,降低了不动杆菌和短杆菌等的比例(宋增福等,2006、2007),还可以有效抑制鱼类致病菌——沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(Gao等,2013)。一般认为,丁酸梭菌对微生物的颞颞作用主要是丁酸梭菌的代谢产物挥发性脂肪酸的作用,有研究表明,在丁酸梭菌的代谢产物中还有抗菌物质也参与了对病原菌的抑制作用(Motomichi等,2004)。饲料中添加丁酸梭菌C2,促进了鳊鱼中肠、后肠中的双歧杆菌增殖,抑制了肠道中的大肠杆菌生长繁殖,不影响肠道厌氧菌的总数,减少了后肠好氧菌的总数,且改变了后肠好氧菌的结构,巩固了假单胞菌优势菌群的地位,降低了不动杆菌属、肠产气杆菌属和短杆菌属细菌的比例

(宋增福等,2007;Pan等,2008)。丁酸梭菌用于防治对虾早期死亡综合症功效显著,其代谢产物丁酸和乳酸是对虾肠道优势益生菌群——双歧杆菌的益生元,可促进双歧杆菌在对虾体内的快速增殖,稳定肠道微生态环境。同时,丁酸和乳酸能够创造酸性环境,消除超氧化物,降低氧化还原电势,抑制对虾体内弧菌等有害病菌的生长,减少肠炎发生;丁酸梭菌和嗜酸乳杆菌属肠道原籍菌,在白对虾肠道更易定植,二者具有优势互补、相互促进,共同维护肠道优势菌群,白对虾的消化系统简单所以更容易形成稳固的肠道生物屏障;嗜酸乳杆菌为胃肠道原籍优势菌群之一,为兼性厌氧菌,与完全厌氧的丁酸梭菌联合能促进肠道有益菌的定植,迅速建立肠道优势菌群,稳定肠道内环境,提升机体抵抗力。影响水产动物肠道微生态平衡的因素既有外环境因素,也有宿主因素。外环境主要是通过改变宿主的生理功能产生的,如有益菌菌群,通过产生细菌素、抗生素和其代谢产物,以及争夺营养、争夺空间以阻止过路菌群入侵,保持自身的稳定性。生态平衡时,可以保持宿主的正常生理功能,如营养、免疫、消化等。

1.2.2 产生丁酸等短链脂肪酸,修复肠道黏膜

丁酸梭菌的代谢产物——丁酸和乳酸等短链脂肪酸是水产动物肠道黏膜上皮细胞的主要能量来源,在肠上皮细胞的丁酸通过羟甲基戊二酰辅酶A循环中的 β -氧化作用进行能量代谢。充足的丁酸和乳酸能保障水产动物肠道细胞的活力,促进粘蛋白和防御素的分泌,强化上皮细胞的紧密连接,促进肠道黏膜快速修复,恢复其生理机能。在虾类饲料中添加丁酸梭菌可增强虾消化道的消化能力,改善其肠道健康状况,提高机体的免疫力和抗应激能力,促进虾类生长。饲料中添加了丁酸梭菌,可以增加凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本囊对虾(*Mar-supenaeus japonicus*)肠道中的短链脂肪酸含量,增加肠道上皮细胞层的厚度,改善肠道健康,修复肠道损伤(Duan等,2017a、2018a)。投喂添加了丁酸梭菌配合饲料56 d后,有效地改善了凡纳滨对虾(*L. vannamei*)肠道形态结构,肠道绒毛高度显著增高(Li等,2019)。

1.2.3 降低肠道内环境pH值,抑制肠道炎症反应

丁酸梭菌的代谢方式独特,能发酵糖类产生大量

的丁酸、乙酸和乳酸以及少量的丙酸和甲酸等短链脂肪酸,在胃肠道中,短链脂肪酸不仅能降低其pH值,而且在产生部位直接被吸收,同时刺激肠道蠕动,有助于治疗相关疾病。如在甲壳动物配合饲料中添加丁酸梭菌,可有效降低甲壳动物白便和拖便的概率,大大减少凡纳滨对虾空肠空胃的发生,抑制肠道上皮细胞的凋亡以及肠黏膜的炎症反应,如肠道萎缩、弯曲、断肠、拖便、发红等现象。

1.2.4 增强机体免疫功能和抗氧化能力

丁酸梭菌具有激活巨噬细胞和NK细胞的作用,还能够刺激肠道黏膜免疫活性,诱导SIgA或IgM的产生,影响参与免疫调节的某些细胞因子,增强机体免疫和血液中白细胞(CD4⁺)的数量。

水产动物配合饲料中添加适量的丁酸梭菌,不仅可以增强机体免疫功能和抗病力,而且有助于提升水产动物抗氧化、抗应激能力。投喂添加了丁酸梭菌饲料后,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)吞噬细胞的吞噬作用显著增强,白细胞超氧阴离子量显著增加,对弧菌病的抵抗力显著增强(Sakai等,1995)。投喂添加了丁酸梭菌饲料后,显著提高了鲢鱼血清酚氧化酶(PO)活性和酸性磷酸酶(ACP)活性,也显著提高了血清与体表黏液中的溶菌酶(LZM)活性、免疫球蛋白M(IgM)含量(Song等,2006)。鲢鱼摄食有活性或灭活的丁酸梭菌添加的饲料之后,其黏液和血清中溶菌酶活性均显著升高(Pan等,2008)。美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)的配合饲料中添加适量的丁酸梭菌,提高了美国红鱼血清和体表黏液中LZM、ACP和PO等酶的活性,血浆中IgM的浓度、血清中补体C3的水平以及吞噬细胞呼吸爆发活性,从而增强了其免疫功能(宋会议,2007)。珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂)幼鱼饲料中添加丁酸梭菌,能够增强幼鱼肝脏、头肾和脾脏中HSP70基因表达的水平以及提高LZM酶活性、白蛋白含量和球蛋白含量,增强机体的非特异性免疫能力,降低哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)攻毒后珍珠龙胆石斑鱼的累积死亡率;同时,机体的总抗氧化能力、还原型谷胱甘肽、过氧化氢等抗氧化酶活性提高和丙二醛水平降低,表明添加丁酸梭菌还可以提高机体的抗氧化能力(黄灵,2017)。珍珠龙胆石斑鱼饲料中添加丁酸梭菌或其发酵液(包含丁酸梭菌及其代谢产物),其非特异性

免疫酶活性均具有促进作用(何瑞鹏等,2017),将芽孢杆菌(*Bacillus cereus* BC-01)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* LAG01)和丁酸梭菌(*Clostridium butyricum* CBG01)等1:1:1比例混合,以 3.0×10^9 cfu/kg饲料的浓度添加配合而成的配合饲料投喂珍珠龙胆石斑鱼幼鱼,幼鱼血清超氧化物歧化酶、溶菌酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等酶活性显著升高,幼鱼非特异性免疫力增强(He等,2017)。银鲟(*Pampus argenteus*)饲料中添加丁酸梭菌,提高其血清LZM和超氧化物歧化酶(SOD)活性及IgM含量,从而提高银鲟非特异性免疫功能(Gao等,2016)。日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)饲料中适量添加丁酸梭菌可以显著提高其肌肉中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性(吴伟等,2011)。投喂添加丁酸梭菌的配合饲料后,提高凡纳滨对虾(*L. vannamei*)血清非特异性免疫水平(刘梦等,2017)。饲料中添加了丁酸梭菌,可以增强凡纳滨对虾(*L. vannamei*)氨胁迫条件下的肠道免疫机能,促进免疫相关基因表达上调(Duan等,2017a、2018a),提高了日本囊对虾(*M. japonicus*)高温应激条件下的肠道抗氧化能力(Duan等,2017b)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)亚硝酸盐胁迫下斑节对虾的抗氧化能力和存活能力(Duan等,2018c)。投喂添加了丁酸梭菌的配合饲料,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的机体免疫力增强,可抑制致病菌哈维氏弧菌的生长(Sumon等,2018)。投喂添加了 1×10^{11} cfu/kg饲料或 1×10^{12} cfu/kg饲料的丁酸梭菌配合饲料56d后,凡纳滨对虾(*L. vannamei*)血清中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)和总一氧化氮酶(TNOS)活性显著升高,有效地提升了机体的免疫功能(Li等,2019)。

1.2.5 提供营养元素,促进水产动物生长

丁酸梭菌在肠道内不仅可产生B族维生素、维生素K等物质,还可产生淀粉酶、蛋白酶、糖苷酶、磷脂合成酶、脂肪酶等酶类。在这些酶的作用下丁酸梭菌发酵产生葡萄糖、麦芽糖等,这有助于机体的消化吸收,同时丁酸梭菌还可产生降解植物饲料中非淀粉多糖的酶,如果胶酶、纤维素酶、葡聚糖酶等物质,参与体内各种代谢,提高饲料的消化与吸收、促进生长。此外,产生的某些寡糖也为其他益生菌提供营养物质。饲料中添加丁酸梭菌能

促进对虾肠上皮细胞增高,增强肠道对促进水产动物——对虾机体对维生素、氨基酸以及钙、磷、铁、硒等矿物元素等营养物质的吸收和转化。投喂添加0.4%丁酸梭菌饲料组的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的最终体重、增重率、特定生长率、肥满度和脏体比指数等指标数值最大,饲料系数最小($P < 0.05$),显著促进其生长(黄灵,2017)。投喂添加了 1×10^{11} cfu/kg的丁酸梭菌活菌菌体和发酵液的配合饲料,显著促进了珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的生长、提高胃蛋白酶、肠道胰蛋白酶、脂肪酶和前肠淀粉酶等消化酶的活性(何瑞鹏等,2017)。饲料中添加1%或5%的丁酸梭状芽孢杆菌,可显著促进日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的生长(吴伟等,2011)。在虾类饲料中添加丁酸梭菌可增强虾类消化道的消化能力,改善其肠道健康状况,提高机体的免疫力和抗应激能力,促进虾类生长。饲料中添加丁酸梭菌,可以提高凡纳滨对虾(*L. vannamei*)、日本囊对虾(*M. japonicus*)和斑节对虾(*P. monodon*)肠道中消化酶活性,增加肠道中短链脂肪酸的含量,促进其生长,降低了饲料系数,增加虾体粗蛋白质含量(Duan等,2017a、2017b、2018a、2018b、2018c)。投喂添加了 1×10^{11} cfu/kg饲料或 1×10^{12} cfu/kg饲料的丁酸梭菌配合饲料56 d后,凡纳滨对虾(*L. vannamei*)的增重率和饲料效率显著升高,生长性能显著改善(Li等,2019)。

2 丁酸梭菌的研发

2.1 菌种来源及其菌种选育

目前使用的丁酸梭菌主要来源于人和畜禽的肠道壁、肠道内容物、动物粪便以及土壤中。尽管已有研究表明,来源于人和畜禽肠道的丁酸梭菌对提升水产动物肠道健康、生长性能、免疫力及其抗应激能力均取得了良好的效果,但由于水产动物与陆生动物由于其生理生态特征差异较大,是否从水产动物本身或养殖水体沉积物环境中分离丁酸梭菌效果更好有待进一步研究。一般来说,益生菌菌种使用要讲究同源性和属地化,同源性是说分离出来的菌,生产出来后再用回去,要能保障原有的性能不变,也不影响原先的微生态平衡,如从水产动物体内分离的丁酸梭菌,进行筛选后生产丁酸梭菌制剂再投喂水产动物;属地化则是要从本地分离获取微生物,防止外来微生物的干扰,然而现实情况却不是这样,大量

使用益生菌的情况下,目前这种生产方式导致使用益生菌可能存在一些潜在风险,需要不断加以监测评估。

对于丁酸梭菌菌种的研发,除根据不同种类或同种不同阶段的水产动物的生理特征,利用不同的筛选手段,从水产动物肠道和养殖水体环境中分离纯化、培养获得性状优良的丁酸梭菌外,可通过基因工程等分子生物学的手段,改良现有的丁酸梭菌菌种,提高其菌株的各方面性能。经产学研用协同合作,建立了完善的丁酸梭菌菌种选育体系,采用独特生物技术,优化分离的对动物有益的高厌氧度的菌种——全新一代丁酸梭菌菌种。

2.2 精选发酵设备和优化生产工艺

丁酸梭菌产品存在活菌和芽孢含量较低,使用成本高以及产品活力受限,导致产品的功能发挥不充分等问题,这些问题的存在除与丁酸梭菌菌种本身的特性有关外,还与生产工艺和条件密切相关。因此,选择先进适宜的发酵设备和科学严谨的发酵生产工艺,进一步提高菌体发酵水平和芽孢率,进而提升产品的使用效果和效益。

2.3 建立规范的产品质控体系

保障研发的丁酸梭菌产品安全高效和环境友好,需要建立规范严格的产品质控体系,然而,目前尚缺乏权威科学的丁酸梭菌产品标准,其活菌和芽孢检测由于尚未建立规范统一的方法,导致产品检测结果差异很大。已有的产品企业标准质量不高,导致产品质量参差不齐,影响了应用效果。

3 丁酸梭菌在水产配合饲料中的应用

迄今为止,丁酸梭菌在畜禽配合饲料中的应用较多,但在水产配合饲料中的应用较少。小规模饲养试验结果表明,配合饲料中单独或联合添加适量丁酸梭菌均能提高凡纳滨对虾、日本囊对虾、斑节对虾、日本沼虾、罗氏沼虾、鲢鱼、美国红鱼、珍珠龙胆石斑鱼等水产动物的生长性能、肠道健康(包括肠道结构和肠道菌群)水平、免疫功能以及抗应激能力,然而其在水产配合饲料中的规模化应用尚未展开,需要进一步加大研发力度,提升应用效果,这对功能性水产配合饲料的研发与应用推广具有重要的意义。从已有的研究结果可以看出,丁酸梭菌在水产动物中适宜的使用剂量可能要远高于陆生动物,例如在猪和肉鸡上的适宜添加量多在 $10^8 \sim 10^9$ cfu/kg,而在鲢鱼、珍珠龙胆石

斑鱼和凡纳滨对虾中使用的适宜的浓度则达 10^{11} ~ 10^{12} cfu/kg 饲料(何瑞鹏等,2017)。提升丁酸梭菌在水产配合饲料中的应用效果,有待于规范其应用技术方

3.1 建立丁酸梭菌菌种筛选、发酵生产技术规范,制定科学的产品标准,保障产品质量,同时建立多层次全方位的科学规范的效果评价指标体系。

3.2 根据丁酸梭菌生物学特性、水产动物的生理特点、水产养殖模式、养殖水环境、饲料的基础配方以及使用丁酸梭菌的目的,建立含丁酸梭菌的功能性水产配合饲料的使用技术规范;同时,建立丁酸梭菌在各类水产配合饲料的应用技术规程,提升其使用效果。

4 展望

丁酸梭菌由于具有耐高温、耐高压、耐胆盐、耐酸以及产生丰富的丁酸、乳酸、B族维生素、蛋白酶、淀粉酶等生物活性物质的特点,而且可以促进其他益生菌的繁殖,是一种绿色饲料添加剂,在水产动物养殖业中应用前景广阔,对促进水产品的安全生产和健康养殖意义重大,然而它目前在水产配合饲料中的应用较少,有待于进一步加强其研发工作,开发并推广能适应不同水产养殖动物、不同生理状态和发育阶段、不同养殖模式和基础饲料配方的丁酸梭菌系列产品,促进水产养殖绿色发展,保障水产品安全和养殖环境可持续发展。

4.1 加大从水产动物肠道和水产养殖环境筛选丁酸梭菌的力度,建立水产饲用丁酸梭菌菌种库。加强菌种选育和发酵工艺研发,提高丁酸梭菌生产效率,降低产品成本。

4.2 加强丁酸梭菌对水产动物生长性能、肠道健康、免疫功能、抑制病原菌和抗应激能力等方面的影响及其作用机制研究。应用基因组学、代谢组学和转录组学的方法、技术和理论,深入研究丁酸梭菌在水产动物肠道内代谢过程、代谢机制及影响其代谢因素等,充分发挥丁酸梭菌的益生作用。

4.3 根据不同的添加剂目的,探讨不同水产养殖动物、生理状态和发育阶段、养殖模式和基础配方下的丁酸梭菌适宜使用时机、适宜使用剂量、适宜使用条件等,以期建立丁酸梭菌的使用技术方案;针对水产动物生理特点,寻找并确定与丁酸梭菌具有协同作用的其他益生菌,并探明其适宜的菌种组合比例和用量;探明丁酸梭菌与低聚木糖、果寡糖等益生元的协

同作用,以更好地发挥丁酸梭菌的功效。

参考文献

- [1] 王亚敏,王印庚.微生态制剂在水产养殖中的作用机理及应用研究进展[J].动物医学进展,2008,29(6):72-75.
- [2] 农业部渔业渔政管理局.2018中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2018:9.
- [3] 刘梦,王苓,田相利,等.三种益生菌及其复合菌对凡纳滨对虾生长和血清非特异性免疫的影响[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2017,47(S1):35-41.
- [4] 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.
- [5] 吴伟,吴滢,瞿建宏.亚硝酸盐胁迫下丁酸梭状芽孢杆菌对日本沼虾应激代偿的调节[J].中国农学通报,2011,27(20):97-102.
- [6] 宋会仪.丁酸梭菌发酵条件的优化及其对美国红鱼免疫指标的影响[D].杭州:浙江大学,2007.
- [7] 宋增福,吴天星,宋会仪.丁酸梭菌C2菌株对鱼类肠道致病菌体外抑制作用研究[J].水生态学杂志,2007,27(3):100-101.
- [8] 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.
- [9] 宋增福,吴天星.丁酸梭菌C2菌株对鲢鱼肠道菌群影响的研究[J].水生态学杂志,2007,27(4):91-93.
- [10] 陈树河,陈秋,常云胜,等.复合益生菌在水产养殖中的作用机制研究进展[J].河南农业科学,2016,45(4):12-18.
- [11] 赵敏孟,单昊书,沈永华,等.丁酸梭菌在畜禽生产中的应用研究进展[J].动物营养学报,2018,30(7):2467-2472.
- [12] 徐亚飞,曾新福,乐敏,等.丁酸梭菌的生物学功能及其在水产养殖中的应用研究进展[J].渔业研究,2018,40(5):408-412.
- [13] 钱怡,周瑾茹,傅玲琳,等.益生菌在工厂化水产养殖中的应用及机制研究进展[J].饲料工业,2018,39(4):56-61.
- [14] 梁静,聂存喜,张文举,等.丁酸梭菌的生物学功能及其在动物生产中的应用[J].动物营养学报,2018,30(5):1639-1646.
- [15] 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.
- [16] Das S, Mondal K, Haque S. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2017,5(2):422-429.
- [17] Dawood M A O, Koshio S, Abdel-Daim M M, et al. Probiotic application for sustainable aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2018:1-18. <https://doi.org/10.1111/raq.12272>.
- [18] Duan Y, 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 & Antimicrobial Proteins, 2018(6):1-8.
- [19] Duan Y, Dong H, 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.
- [20] Duan Y, Wang Y, Dong H, et al. Changes in the intestine microbial, digestive and immune-related genes of Litopenaeus vannamei in response to dietary probiotic Clostridium butyricum supplementation[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 2191.
- [21] Duan Y, Zhang Y, Dong H, 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.
- [22] Duan Y, Zhang Y, Dong H, 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.
- [23] Gao Q X, Xiao C F, Min M H, 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(6) :936-941.
- [24] Gao Q, Xiao Y, 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.
- [25] 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.
- [26] Hoseinifar S H, Sun Y, Wang A, 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb>.
- [27] Kong Q, Chen L, Zhou W, et al. Optimization of starch medium for Clostridium butyricum[J]. Science & Technology of Food Industry, 2009, 30(12):197-199.
- [28] Li H, Tian X, Dong S. Growth performance, non-specific immunity, intestinal histology and disease resistance of Litopenaeus vannamei fed on a diet supplemented with live cells of Clostridium butyricum[J]. Aquaculture, 2019, 498: 470-481.
- [29] Motomichi T, Haruhiko T, Hiroyuki Y, et al. The effect of probiotic treatment with Clostridium butyricum on enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 infection in mice[J]. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2004, 41:219-226.
- [30] Pan X, Wu T, Zhang L, et al. In vitro evaluation on adherence and antimicrobial properties of a candidate probiotic Clostridium butyricum CB2 for farmed fish[J]. Journal of applied microbiology, 2008, 105:1623-1629.
- [31] Sakai M, Yoshida T, Atsuta S, et al. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of Clostridium butyricum bacterin[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(2): 187-190.
- [32] S. Savic. Antibiotic Use in Animals[M]. London: Intech Open, 2018:115-132.
- [33] Song Z, Wu T, Cai L, et al. Effects of dietary supplementation with Clostridium butyricum on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuyi*[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2006, 7(7): 596-602.
- [34] 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 Journal of King Saud University-Science, 2018,30(1): 21-28.

(编辑:沈桂宇,guiyush@126.com)

作者简介 Author



艾春香,理学博士,厦门大学海洋与地球学院教授,主要从事水产动物营养与饲料学的教学科研工作,特别是在水产动物免疫营养学、营养生态学及高效环境友好型水产配合饲料研发等方面开展了一系列工作。先后主持和参加了国家公益性行业(农业)专项、国家“973”项目、国家“863”项目、国家自然科学基金项目、福建省重大科技专项等科研课题20多项,发表学术论文80多篇,参编《水生动物营养与配合饲料学》教材一部,主持制订水产配合饲料国家标准1项、农业行业标准2项和福建省地方标准3项,先后获得省市级科技进步奖一等奖1项、二等奖2项、三等奖4项,福建省标准贡献奖二等奖1项和三等奖2项。现兼任全国饲料评审委员会委员、全国饲料工业标准化技术委员会委员、中国水产学会水产动物营养与饲料专业委员会委员、中国渔业协会鳃业工作委员会专家委员会委员、福建省水产饲料研究会理事长等。