



酸化剂对大口黑鲈生长、抗氧化能力和肠道健康的影响

何家鑫¹, 杨婷婷¹, 郭凯², 关舒³, 郜卫华^{1*}, 罗凯^{1*}, 迟淑艳⁴

(1. 长江大学, 湖北省涝渍灾害与湿地农业重点实验室, 湖北 荆州 434024;

2. 帝斯曼(中国)有限公司动物营养与健康部门, 上海 200020;

3. 帝斯曼大亚太区动物营养与保健部门, 新加坡 159471;

4. 广东海洋大学, 广东南海水产经济动物养殖重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为了探究饲料添加酸化剂对大口黑鲈生长性能、抗氧化能力和肠道健康的影响, 用含不同酸化剂水平 (0%、0.05%、0.10%、0.15% 和 0.20%) 的 5 组等氮等脂饲料投喂初始体重为 (21.31±0.18) g 的大口黑鲈 64 d。结果显示, 大口黑鲈增重率和特定生长率随着饲料中酸化剂添加量的提高呈先升后降的变化, 在 0.15% 组均达到最大值。与对照组相比, 饲料添加 0.10%~0.15% 的酸化剂显著降低了大口黑鲈饲料系数, 显著提高了大口黑鲈全鱼粗脂肪含量和蛋白质沉积率以及对饲料干物质、粗脂肪和总能的表现消化率。在饲料酸化剂添加量为 0.15% 时, 大口黑鲈肠道脂肪酶活性显著高于对照组。相比于对照组, 0.15% 组的甘油三酯含量和总胆固醇含量显著降低, 0.15% 组的高密度脂蛋白胆固醇含量显著升高。饲料中酸化剂添加量在 0.10%~0.15% 时, 大口黑鲈血清总抗氧化能力以及肠道总抗氧化能力和超氧化物歧化酶活性显著提高, 血清谷草转氨酶活性和肝脏丙二醛含量显著降低。0.15% 组肠道绒毛长度、绒毛宽度、肌层厚度均显著大于对照组。与对照组相比, 饲料中添加 0.15% 的酸化剂显著上调大口黑鲈肠道抗氧化相关因子 (*nrf2*、*cat* 和 *sod1*) 基因的 mRNA 表达水平, 显著上调抑炎因子 (*il-10*) 基因的 mRNA 表达水平, 饲料中添加 0.20% 的酸化剂显著下调促炎因子 (*tnf-α*、*il-1β*) 基因的 mRNA 表达水平。以增重率和饲料系数为评价指标, 基于折线模型结果, 大口黑鲈饲料中酸化剂适宜添加量为 0.148%~0.152%。研究表明, 饲料中添加 0.15% 的酸化剂能够促进大口黑鲈的生长, 提高抗氧化能力, 降低肠道炎症水平以及维持肠道健康。

关键词: 大口黑鲈; 酸化剂; 生长性能; 抗氧化能力; 肠道健康

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

全球水产养殖处于高速发展阶段, 抗生素被大规模应用于水产养殖中, 以提高生长性能和营养物质的消化率^[1-3]。然而, 抗生素的广泛使用引起了耐药病原体的增加、环境危害和食品安全等许多严重问题^[4]。因此, 抗生素在饲料中添加使

用受到许多国家的限制^[5]。这促使研究人员开发有效的抗生素生长促进剂替代品, 以改善水生动物的健康和生长性能^[6-7]。短链有机酸 (C1~C7) 及其盐类或混合物, 通常称为酸化剂, 是有前景的抗生素生长促进剂的替代品, 并越来越受到水产

收稿日期: 2022-10-24 修回日期: 2023-03-15

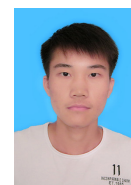
资助项目: 广东省重点领域研发计划 (2021B0202050002); 湖北省自然科学基金 (2023AFB174)

第一作者: 何家鑫 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: 2217898269@qq.com;

杨婷婷, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: 2041175104@qq.com

通信作者: 郜卫华, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: gaoweihua@yangzeu.edu.cn;

罗凯, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: luokaikmt@163.com



养殖研究人员的关注^[8]。

酸化剂通过降低胃和前肠消化物的 pH 值, 刺激消化酶活性, 进而提高饲料消化率和矿物质的生物利用率, 从而提高饲料效率, 增强养殖水生动物的生长性能^[9]。酸化剂也可以作为肠细胞的能量来源, 并为肠上皮细胞的增殖和恢复提供能量^[2, 9-11]。此外, 酸化剂已被证实可提高各种养殖水生动物的免疫和抗氧化应激能力^[12-16]。有研究评估了酸化剂对免疫和抗氧化相关基因的影响^[15, 17-22]。酸化剂对抗氧化能力的积极影响可能与提高矿物质的生物利用率有关(例如镁、铜、锌和硒), 这是由于上述矿物质是抗氧化酶(例如锌或铜超氧化物歧化酶)的辅助因子^[23-24]。甲酸盐在饲料中有较高的稳定性, 是水产养殖中使用最广泛的酸化剂之一^[25-26]。对不同养殖鱼类的研究表明, 甲酸盐对生长性能、饲料利用和免疫反应^[9, 11, 14, 21-22, 27-29]具有有益影响。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 原产于美国加利福尼亚州, 又称为加州鲈, 于 20 世纪 80 年代引进我国。大口黑鲈具有养殖周期短、抗病力强、适温性广等特性, 并且肉质鲜美、营养丰富, 广受消费者喜爱。随着人工繁殖及苗种培育的成功, 大口黑鲈产量逐年提高, 2021 年我国大口黑鲈总产量已超过 70 万 t^[30]。考虑到酸化剂对水产养殖动物的促生长效果明显, 大口黑鲈作为我国重要的淡水经济鱼类, 且到目前为止未见酸化剂在大口黑鲈上的报道。因此, 本实验以酸化剂为原料, 探讨饲料酸化剂水平对大口黑鲈生长、抗氧化能力和肠道健康的影响, 为酸化剂在大口黑鲈配合饲料中的合理应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验饲料

本实验以鱼粉、豆粕和鸡肉粉为主要蛋白源, 以鱼油、豆油和大豆磷脂粉为主要脂肪源, 以三氧化二钼为外源指示剂, 配制出 5 组等氮等脂饲料。饲料中酸化剂 [帝斯曼 (中国) 有限公司] 的添加水平分别为 0%、0.05%、0.10%、0.15% 和 0.20% (表 1)。原料经粉碎机 (30B, 常州市荣臻干燥设备有限公司) 粉碎后过 80 目筛, 按照配比由少到多逐级混合, 添加鱼油和豆油后再经混合机 (SYH-100L, 常州圣万达干燥设备有限公司) 混合均匀, 最终经制粒机制成粒径为 2 mm 的膨化饲料, 于 -20 °C 保存待用。

1.2 实验用鱼及饲养管理

大口黑鲈购自荆门市华贵渔业有限公司, 于室内循环水养殖系统进行 14 d 的暂养, 暂养期间投喂对照组饲料 (0% 酸化剂), 以适应养殖环境和饲料。正式实验开始前, 大口黑鲈禁食 24 h, 挑选体色正常、无病无伤, 初始体重为 (21.31±0.18) g 的大口黑鲈 375 尾, 随机分配到 15 个圆柱形养殖桶 (300 L/桶), 每 3 个养殖桶为 1 个处理, 每个重复 25 尾。在循环水系统中进行为期 64 d 的养殖实验, 每天饱食投喂 3 次 (8:00、13:00 和 18:00), 记录投喂量。养殖期间水温为 (27±1) °C, 溶解氧 >5 mg/L, pH 为 7.5±0.4, 氨氮 <0.3 mg/L, 亚硝酸盐 <0.1 mg/L。本研究获得了长江大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守《中国实验动物管理条例》伦理规范, 并按照长江大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 样品采集

养殖实验开始前, 随机挑选初始体重为 (21.31±0.18) g 的大口黑鲈 10 尾, 用于分析蛋白质沉积率和脂肪沉积率。养殖实验开始 1 周后, 每天早晚收集粪便, 烘干后于 -20 °C 保存, 用于表观消化率测定。养殖实验结束后, 大口黑鲈禁食 24 h, 使用 MS-222 (Sigma, 美国) 麻醉, 统计大口黑鲈数量, 并测量体重和体长, 用于生长指标和肥满度的测定。随机取 3 尾大口黑鲈用于全鱼常规营养成分分析。随机取 10 尾鱼的尾静脉取血, 于 4 °C 静置 24 h, 4 °C 离心 (3 000×g) 10 min, 取上清液于 -80 °C 保存, 用于血清生化指标和酶活性测定。称量取血后的大口黑鲈内脏和肝脏重量, 用于脏体比和肝体比的测定。随机取 3 尾鱼采集前肠, 使用 4% 多聚甲醛固定液固定, 用于肠道组织切片观察。剩下的大口黑鲈用于收集胃、肝脏和前肠组织, 于 -80 °C 保存, 用于酶活性测定或基因表达分析。

1.4 指标检测

饲料、鱼体和粪便组成分析 饲料原料、饲料、全鱼和粪便的组分分析方法: 水分含量用 105 °C 烘箱干燥恒重法 (GB/T 5009.3—2016) 测定, 粗蛋白含量用凯氏定氮法 (GB/T 5009.5—2016) 测定, 粗脂肪含量用索氏抽提法 (GB/T 5009.6—2016) 测定, 灰分含量用 550 °C 灼烧恒重法 (GB/T

表 1 实验饲料配方及营养组成 (干重)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of experimental diets (dry matter)

原料 ingredients	组别 diet groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
鱼粉/% fish meal	50	50	50	50	50
鸡肉粉/% chicken powder	5	5	5	5	5
豆粕/% soybean meal	14	14	14	14	14
谷朊粉/% gluten	3	3	3	3	3
面粉/% wheat flour	16	16	16	16	16
α-纤维素/% α-cellulose	4.55	4.50	4.45	4.40	4.35
鱼油/% fish oil	1	1	1	1	1
豆油/% soybean oil	1	1	1	1	1
大豆磷脂粉/% soybean phospholipid powder	2	2	2	2	2
预混料/% premix ¹⁾	2	2	2	2	2
氯化胆碱/% choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
磷酸二氢钙/% Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1	1	1	1	1
抗氧化剂/% antioxidants	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
三氧化二钇/% yttrium oxide	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
酸化剂/% acidifier ²⁾	0	0.05	0.10	0.15	0.20
成分分析 component analysis					
水分/% moisture	8.96	8.48	6.36	5.03	7.79
粗蛋白/% crude protein	49.53	50.08	49.75	50.12	49.83
粗脂肪/% crude lipid	7.48	7.57	7.73	7.80	7.69
灰分/% ash	11.20	11.36	11.57	11.68	11.79
总能/(kJ/g) gross energy	21.36	21.12	21.45	21.41	21.25

注: 1) 预混料含有维生素A≥25×10⁴ IU, 维生素D₃ 7.5×10⁴-15×10⁴ IU, 维生素E≥2.3 g/kg, 维生素K₃≥0.25 g/kg, 维生素C≥5 g/kg, 维生素B₁≥0.48 g/kg, 维生素B₂≥0.75 g/kg, 维生素B₆≥0.75 g/kg, 维生素B₁₂≥3 mg/kg, 烟酰胺≥2 g/kg, D-泛酸钙≥2 g/kg, 叶酸≥0.1 g/kg, D-生物素≥5 mg/kg, MgSO₄·7H₂O≥6.5 g/kg, FeSO₄·7H₂O 2-36 g/kg, ZnSO₄ 6.0-7.5 g/kg, CuSO₄·5H₂O 0.25-1.25 g/kg, MnSO₄·H₂O 0.5-5.0 g/kg, CoSO₄·7H₂O 35-100 mg/kg, Na₂SeO₃ 9-25 mg/kg, Ca(IO₃)₂ 125-300 mg/kg, 肌醇≥4.75 g/kg, 氯化胆碱≤200 g/kg; 2) 酸化剂含甲酸≥45%, 富马酸≥0.6%, 琥珀酸≥0.6%, 苹果酸≥0.3%。

Notes: 1) premix contains vitamin A≥25×10⁴ IU, vitamin D₃ 7.5×10⁴-15×10⁴ IU, vitamin E ≥2.30 g/kg, vitamin K₃ ≥0.25 g/kg, vitamin C≥5 g/kg, vitamin B₁ ≥0.48 g/kg, vitamin B₂ ≥0.75 g/kg, vitamin B₆ ≥0.75 g/kg, vitamin B₁₂ ≥3 mg/kg, nicotinamide ≥2 g/kg, D-pantothenic acid ≥2 g/kg, folic acid ≥0.1 g/kg, D-biotin ≥5 mg/kg, MgSO₄·7H₂O ≥6.5 g/kg, FeSO₄·7H₂O 2-36 g/kg, ZnSO₄ 6.0-7.5 g/kg, CuSO₄·5H₂O 0.25-1.25 g/kg, MnSO₄·H₂O 0.5-5.0 g/kg, CoSO₄·7H₂O 35-100 mg/kg, Na₂SeO₃ 9-25 mg/kg, Ca(IO₃)₂ 125-300 mg/kg, inositol ≥4.75 g/kg; choline chloride ≤200 g/kg; 2) acidifier contains formic acid ≥45%, fumaric acid ≥0.6%, succinate acid ≥0.6%, malic acid ≥0.3%.

5009.4—2016) 测定。饲料原料、饲料和粪便的总能用氧弹仪 (6200 Isoperibol Calorimeter, Illinois, 美国) 测定, 饲料和粪便中氧化钇含量用电感耦合等离子体质谱法 (PE avio 500) 测定。

生化指标和酶活性测定 总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、总胆固醇 (T-CHO)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、总甘油三酯 (TG)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、胃蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、胰蛋白酶、总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和丙二醛 (MDA) 等指标均采用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定, 测定方法参照试剂盒说明书进行。

肠道组织切片 取固定后的大口黑鲈前肠样本进行常规石蜡包埋切片, 厚度约 5 μm。使用苏木素-伊红 (H.E) 染色, 中性树胶封片, 对前肠进行组织学观察并拍照。使用 ImageJ 软件对前肠肌层厚度、绒毛长度和绒毛宽度进行测量。

实时荧光定量 PCR 分析 使用 Total RNA kit I (Omega Bio-Tek, 美国) 试剂盒提取肠道 RNA, 使用超微量分光光度计 (Nano-400A) 测定 RNA 的浓度与纯度。使用 MonScript™ RT III Super Mix with dsDNase (Two-Step) 反转录试剂盒 (莫纳生物科技有限公司) 合成 cDNA。实时定量 PCR (qPCR) 采用 Line Gene 9600 Plus 实时 PCR 系统 (杭州博日科技股份有限公司)。20 μL 反应体系: 10 μL

MonAmp™ ChemoHS qPCR, 0.4 μL 正向引物 (10 μmol/L), 0.4 μL 反向引物 (10 μmol/L), 1.5 μL cDNA 模板, 7.7 μL 无 RNA 酶水。反应程序: 预变性 95 °C 持续 10 min; 变性 95 °C 持续 10 s, 退火 60 °C 持续 10 s, 延伸 72 °C 持续 30 s, 共循环 40 次。

使用 Primer Premier 5.0 设计大口黑鲈肠道炎症和抗氧化相关基因引物。大口黑鲈肿瘤坏死因子-α (*tnf-α*)、白细胞介素-1β (*il-1β*)、白细胞介素-

10 (*il-10*)、转化生长因子-β1 (*tgf-β1*)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (*keap1*)、转录因子 NF-E2 相关因子 2 (*nrf2*)、铜锌超氧化物歧化酶 (*sod1*)、过氧化氢酶 (*cat*) 等基因以及 β-actin 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成 (表 2)。β-actin 作为内参基因, 使用 2^{-ΔΔC_T} 法^[31] 计算目的基因的相对表达量。

表 2 实时荧光定量引物序列

Tab. 2 Nucleotide sequence of primers for real time fluorescence quantification

基因 genes	引物序列(5'-3') primers sequence (5'-3')	序列号 accession no.
<i>tnf-α</i>	F: CTTCTGCTACAGCCAGGCATCG R: TTTGGCACACCCAGCTCACC	XM_038710731.1
<i>il-1β</i>	F: CGTGACTGACAGCAAAAAGAGG R: GATGCCAGAGCCACAGTTC	XM_038733429.1
<i>il-10</i>	F: CGGCACAGAAATCCAGAGC R: CAGCAGGCTCACAAAATAAACATCT	XM_038696252.1
<i>tgf-β1</i>	F: GCTCAAAGAGAGCGAGGATG R: TCCTCTACCATTGCGAATCC	XM_038693206.1
<i>keap1</i>	F: GTGGTGGGAAGACTTATTG R: TCCAGGTGCTTAGTGAGG	XM_038728593.1
<i>nrf2</i>	F: TCACCAAAGACAAGCGTAA R: CAGGCAGATTGATAATCATAGA	XM_038720536.1
<i>sod1</i>	F: AGACAATACAAATGGGTGC R: CTTTGCGACATTATCTGCT	XM_038708943.1
<i>cat</i>	F: TGCTGTCCGCTTCTCCAC R: TCCCAGTTGCCCTCTCA	XM_038704976.1
<i>β-actin</i>	F: TCCTCGGTATGGAGTCTTG R: GTCAGCGATTCCAGGGTA	XM_038712920.1

数据分析 相关指标计算公式:

存活率 (survival rate, SR, %) = $N_t/N_0 \times 100\%$

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $(W_t - W_0)/W_0 \times 100\%$

特定生长率 (specific growth rate, SGR, %/d) = $(\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%$

摄食率 (feed intake rate, FIR, %/d) = $W_f/[t \times (W_0 + W_t)/2] \times 100\%$

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR) = $W_f/(W_t - W_0)$

肥满度 (condition factor, CF, g/cm³) = $(W/L^3) \times 100$

脏器指数 (viscerosomatic index, VSI, %) = $(W_v/W) \times 100\%$

肝体指数 (hepatosomatic index, HSI, %) = $(W_h/W) \times 100\%$

蛋白质效率 (protein efficiency ratio, PER) = $(W_t - W_0)/(W_f \times W_p)$

脂肪效率 (lipid efficiency ratio, LER) = $(W_t - W_0)/(W_f \times W_L)$

蛋白质沉积率 (protein deposition ratio, PDR, %) = $(W_t \times T_p - W_0 \times I_p)/(W_f \times W_p) \times 100\%$

脂肪沉积率 (lipid deposition ratio, LDR, %) = $(W_t \times T_l - W_0 \times I_l)/(W_f \times W_L) \times 100\%$

干物质表观消化率 (ADCDM, %) = $(1 - D/F) \times 100\%$

某一组分表观消化率 (ADCX, %) = $[1 - (D/F) \times (F_i/D_i)] \times 100\%$

式中, N_t (尾) 和 N_0 (尾) 分别为终末尾数和初始尾数; W_t (g) 和 W_0 (g) 分别为终末均重和初始均重; t (d) 为养殖实验天数; W_f (g) 为总摄食量; W (g) 为终末体重; L (cm) 为终末体长; W_v (g) 为内脏重; W_h (g) 为肝脏重; W_p (%) 为饲料粗蛋白含量; W_L (%) 为饲料粗脂肪含量; I_p (%) 为初始鱼体粗蛋白含量; T_p (%) 为终末鱼体粗蛋白含量; I_l (%) 为初始鱼体粗脂肪含量; T_l (%) 为终末鱼体粗脂肪含

量; $D_i(\%)$ 为饲料中三氧化二钨含量, $F(\%)$ 为粪便中三氧化二钨含量, $D_i(\%)$ 为饲料中某一组分含量, $F_i(\%)$ 为粪便中某一组分含量。

本研究所有数据均以平均值±标准差 (mean±SD) 的方式表示。采用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 使用 Tukey 氏方法进行多重比较, 显著水平为 $P<0.05$ 。以增重率和饲料系数为指标, 采用折线模型拟合分析大口黑鲈饲料最适酸化剂添加量。

2 结果

2.1 酸化剂对大口黑鲈生长性能和饲料利用的影响

大口黑鲈生长性能结果显示, 各组间存活率无显著差异 ($P>0.05$) (表 3)。随着酸化剂添加量提高, 大口黑鲈的终末均重、增重率和特定生长率均先升高后降低, 均在 0.15% 组达最高 ($P<0.05$)。0.10% 和 0.15% 组的摄食率显著低于 0.20% 组 ($P<0.05$), 0.10% 和 0.15% 组的饲料系数显著低于对照组和 0.20% 组 ($P<0.05$)。饲料中添加 0.15% 的酸化剂显著提高了大口黑鲈的蛋白质效率 ($P<0.05$)。根据增重率和饲料系数指标, 通过折线回归模型分析, 结果显示, 酸化剂在大口黑鲈饲料中的最适添加量为 0.148%~0.152% (图 1)。各组间大口黑鲈的肥满度、脏体比和肝体比无显著差异

($P>0.05$)。

2.2 酸化剂对大口黑鲈全鱼组成和营养物质沉积率的影响

大口黑鲈体组成结果显示, 饲料中添加酸化剂对全鱼水分、粗蛋白和灰分含量没有显著影响 ($P>0.05$) (表 4)。与对照组相比, 饲料中添加 0.15% 的酸化剂显著提高全鱼粗脂肪含量、蛋白沉积率和脂肪沉积率 ($P<0.05$)。

2.3 酸化剂对大口黑鲈营养物质表观消化率的影响

大口黑鲈对饲料的表观消化率结果显示, 饲料添加酸化剂使大口黑鲈对饲料的粗蛋白表观消化率无显著影响 ($P>0.05$) (表 5)。饲料添加 0.15% 的酸化剂显著提高了大口黑鲈对饲料的干物质、粗脂肪和总能的表观消化率 ($P<0.05$)。

2.4 酸化剂对大口黑鲈消化酶活性的影响

各组间大口黑鲈胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性无显著差异 ($P>0.05$), 但 0.15% 组中上述三种酶活性较对照组均有提高 (表 6)。各组间大口黑鲈肠道胰蛋白酶和淀粉酶活性无显著差异 ($P>0.05$), 但酸化剂添加后胰蛋白酶和淀粉酶活性均较对照组有提高。肠道脂肪酶活性随酸化剂添加水平的提高而升高, 当添加水平为 0.15%~0.20% 时, 脂肪酶活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3 酸化剂对大口黑鲈生长性能和饲料利用的影响

Tab. 3 Effect of dietary acidifier on growth performance and feed utilization of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
初始均重/g IBW	21.33±0.23	21.2±0.00	21.33±0.23	21.33±0.23	21.33±0.23
终末均重/g FBW	60.42±5.04 ^b	63.93±0.51 ^{ab}	67.54±1.98 ^{ab}	72.81±2.60 ^a	66.56±4.90 ^{ab}
存活率/% SR	97.33±2.31	94.67±2.31	94.67±6.61	94.67±9.24	98.67±2.31
增重率/% WGR	183.33±25.51 ^b	201.54±2.38 ^{ab}	216.56±5.83 ^{ab}	241.27±9.54 ^a	211.87±19.56 ^{ab}
特定生长率/(%/d) SGR	1.62±0.14 ^b	1.73±0.02 ^{ab}	1.80±0.03 ^{ab}	1.92±0.04 ^a	1.78±0.09 ^{ab}
摄食率/(%/d) FIR	1.48±0.10 ^{ab}	1.53±0.05 ^{ab}	1.44±0.33 ^b	1.47±0.07 ^b	1.64±0.03 ^a
饲料系数 FCR	0.99±0.04 ^a	0.98±0.03 ^{ab}	0.88±0.04 ^b	0.87±0.06 ^b	1.06±0.06 ^a
蛋白质效率 PER	2.04±0.08 ^{bc}	2.05±0.06 ^{abc}	2.28±0.10 ^{ab}	2.31±0.14 ^a	1.91±0.11 ^c
脂肪效率 LER	13.48±0.51 ^{ab}	13.54±0.37 ^{ab}	14.70±0.63 ^a	14.86±0.92 ^a	12.36±0.70 ^b
肥满度/(g/cm ³) CF	2.08±0.14	2.06±0.13	2.01±0.12	2.07±0.16	2.01±0.10
脏体比/% VSI	7.37±0.63	7.52±0.59	7.40±0.74	7.26±0.52	7.23±0.65
肝体比/% HSI	2.62±0.90	2.88±0.93	2.87±0.95	2.79±0.78	2.70±0.68

注: 同行的不同小写字母上标表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Notes: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), the same below.

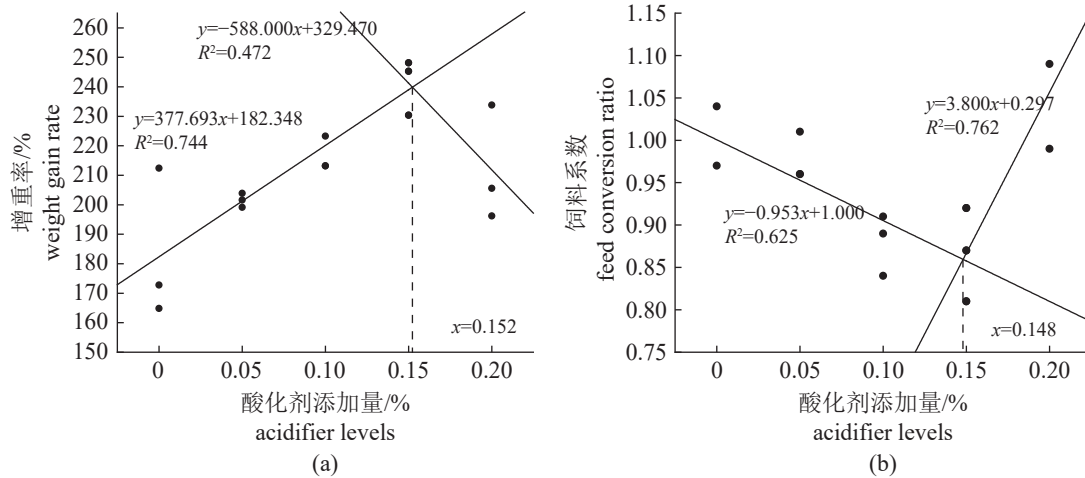


图 1 大口黑鲈增重率和饲料系数的折线模型

(a) 增重率与饲料中酸化剂添加量的折线模型, 拟合方程分别为 $y=377.693x+182.348$ 和 $y=-588.000x+329.470$, 其中 x 表示饲料中酸化剂的添加量。“ $x=0.152$ ”表示饲料酸化剂的最佳添加量。(b) 饲料系数与饲料中酸化剂添加量的折线模型, 拟合方程分别为 $y=-0.953x+1.000$ 和 $y=3.800x+0.297$, 其中 x 表示饲料中酸化剂的添加量。“ $x=0.148$ ”表示饲料酸化剂的最佳添加量。

Fig. 1 Broken-line model of weight gain rate and feed conversion ratio of *M. salmoides*

(a) broken-line model between the weight gain rate and dietary acidifier levels; the fitted equations were $y=377.693x+182.348$ and $y=-588.000x+329.470$, in which x represents the addition levels of dietary acidifier. “ $x = 0.152$ ” represents the optimal supplementation of dietary acidifier. (b) broken-line model between the feed conversion ratio and dietary acidifier levels; the fitted equations were $y=-0.953x+1.000$ and $y=3.800x+0.297$, in which x represents the addition levels of dietary acidifier. “ $x=0.148$ ” represents the optimal supplementation of dietary acidifier.

表 4 酸化剂对大口黑鲈全鱼组成和营养物质沉积率的影响

Tab. 4 Effect of dietary acidifier on whole body composition and nutrient retention of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
水分/% moisture	70.52±0.90	70.48±0.45	70.40±0.78	70.38±0.33	70.33±0.78
粗蛋白/% crude protein	17.30±0.13	17.34±0.56	17.54±0.16	17.42±0.43	17.36±0.06
粗脂肪/% crude lipid	6.11±0.08 ^d	6.88±0.12 ^c	7.53±0.02 ^b	7.58±0.09 ^b	7.87±0.10 ^a
灰分/% ash	4.21±0.13	4.21±0.07	4.22±0.21	4.22±0.19	4.23±0.09
蛋白质沉积率/% PDR	38.18±1.36 ^{ab}	37.73±1.04 ^{ab}	41.73±1.67 ^a	42.01±2.54 ^a	34.96±1.81 ^b
脂肪沉积率/% LDR	91.43±3.23 ^d	106.40±2.96 ^c	128.35±4.51 ^{ab}	129.20±7.52 ^a	115.88±4.93 ^{bc}

表 5 酸化剂对大口黑鲈营养物质表观消化率的影响

Tab. 5 Effect of dietary acidifier on nutrient substance apparent digestibility of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
干物质/% dry matter	79.99±0.54 ^c	81.75±0.43 ^b	84.11±0.63 ^a	83.38±0.59 ^a	83.57±0.21 ^a
粗蛋白/% crude protein	93.91±0.35	93.70±0.06	94.30±0.26	94.10±0.44	93.90±0.27
粗脂肪/% crude lipid	83.73±0.88 ^b	85.61±0.35 ^b	89.03±0.46 ^a	89.35±0.46 ^a	87.07±1.50 ^{ab}
总能/(kJ/g) gross energy	86.56±0.40 ^b	87.83±0.53 ^{ab}	89.56±0.44 ^a	88.77±0.25 ^a	88.80±0.08 ^a

2.5 酸化剂对大口黑鲈血清生化指标的影响

饲料添加酸化剂对大口黑鲈血清 TP 和 ALB 无显著影响 ($P>0.05$)。随着饲料中酸化剂添加水平的提高, 血清中 TG 和 T-CHO 含量均先降低后

升高, 当饲料中酸化剂添加量分别为 0.15% 时, TG 和 T-CHO 含量达最小值 ($P<0.05$)。当酸化剂添加水平为 0.15% 时, 血清 HDL-C 含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。饲料添加酸化剂对大口黑鲈血

表 6 酸化剂对大口黑鲈消化酶活性的影响

Tab. 6 Effect of dietary acidifier on the activity of digest enzymes of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
胃 stomach					
蛋白酶/(U/mg prot) protease	9.41±0.8	10.07±0.61	10.20±1.03	13.51±0.98	11.31±1.22
脂肪酶/(U/g prot) lipase	4.79±0.45	4.71±0.38	4.94±0.05	5.00±0.26	4.90±0.84
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	0.16±0.02	0.18±0.07	0.24±0.03	0.25±0.02	0.18±0.04
肠道 intestine					
胰蛋白酶/(U/mg prot) trypsin	1 150.01±38.78	1 214.50±62.94	1 279.48±24.85	1 277.69±58.43	1 216.15±81.41
脂肪酶/(U/g prot) lipase	3.56±0.48 ^b	4.28±0.12 ^{ab}	5.51±0.19 ^{ab}	7.16±0.28 ^a	7.09±0.57 ^a
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	0.14±0.01	0.16±0.01	0.17±0.06	0.16±0.01	0.16±0.02

清 LDL-C 含量无影响 ($P>0.05$)。酸化剂的添加显著降低血清 AST 活性 ($P<0.05$), 而对血清 ALT 活性无显著影响 ($P>0.05$) (表 7)。

表 7 酸化剂对大口黑鲈血清生化指标的影响

Tab. 7 Effect of dietary acidifier on serum biochemical indices of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
总蛋白/(g/L) TP	38.06±2.73	42.22±2.88	45.21±1.79	42.63±1.09	45.07±0.38
白蛋白/(g/L) ALB	12.43±1.09	13.59±0.33	13.92±1.34	12.79±0.29	13.91±0.49
甘油三酯/(mmol/L) TG	3.15±0.23 ^a	3.04±0.43 ^a	2.47±0.10 ^b	2.32±0.17 ^b	2.38±0.38 ^b
总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	7.93±0.27 ^a	7.04±0.59 ^b	6.83±0.48 ^b	6.53±0.44 ^b	6.82±0.19 ^b
高密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) HDL-C	5.18±0.09 ^b	6.12±0.78 ^{ab}	6.45±0.11 ^{ab}	7.65±0.06 ^a	6.22±0.08 ^{ab}
低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) LDL-C	7.26±0.04	7.12±0.05	7.00±0.06	6.69±0.05	6.75±0.08
谷草转氨酶/(U/L) AST	11.52±0.22 ^a	7.56±0.35 ^b	7.92±0.44 ^b	8.24±0.97 ^b	6.61±0.26 ^b
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	1.49±0.06	1.23±0.05	1.23±0.07	1.28±0.05	1.19±0.06

2.6 酸化剂对大口黑鲈抗氧化能力的影响

当酸化剂添加量为 0.10%~0.15% 时, 大口黑鲈血清和肠道的 T-AOC 均显著高于对照组 ($P<0.05$)。酸化剂对大口黑鲈肝脏的 T-AOC、SOD 活性和 CAT 活性无显著影响 ($P>0.05$)。与对照组相比, 肝脏的 MDA 含量在酸化剂添加组显著降低 ($P<0.05$)。饲料添加酸化剂对大口黑鲈血清和肠道的 CAT 活性、MDA 含量以及血清 SOD 活性无显著影响 ($P>0.05$)。随着酸化剂添加水平的提高, 肠道 SOD 活性先升高后降低, 0.10% 组和 0.15% 组的 SOD 活性显著高于对照组 ($P<0.05$) (表 8)。

根据大口黑鲈生长性能相关结果, 选取了 0% 组、0.15% 组和 2.0% 组的肠道进行抗氧化相关基因的 mRNA 表达水平的研究。饲料添加 0.15% 和 0.20% 酸化剂的大口黑鲈肠道 *nrf2*、*sod1* 和 *cat* 的 mRNA 表达水平均显著高于对照组 ($P<0.05$)

(图 2)。0.15% 组大口黑鲈 *keap1* 的 mRNA 表达水平显著低于对照组和 0.20% 组 ($P<0.05$)。

2.7 酸化剂对大口黑鲈肠道形态的影响

通过肠道切片形态结构观察发现, 所有处理组的大口黑鲈肠道均有完整的上皮屏障和未受损的整齐的肠道绒毛结构 (图版)。对照组的大口黑鲈肠道绒毛结构完整, 杯状细胞和上皮细胞排列整齐, 杯状细胞数目较多。饲料添加 0.05%~0.15% 的酸化剂时, 杯状细胞数目增多, 排列紧密。随着酸化剂水平提高至 0.20%, 大口黑鲈肠道中杯状细胞排列凌乱, 数目减少。

大口黑鲈肠道形态学参数见表 9, 与对照组相比, 饲料中添加 0.10%~0.20% 的酸化剂显著增加大口黑鲈肠道肌层厚度 ($P<0.05$), 添加 0.15%~0.20% 的酸化剂显著增加大口黑鲈肠道绒毛长度 ($P<0.05$)。肠道绒毛宽度随着饲料中酸化剂水平的

表 8 酸化剂对大口黑鲈抗氧化能力的影响

Tab. 8 Effect of dietary acidifier on antioxidant indices of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
肝脏 liver					
总抗氧化能力/(mmol/g prot) T-AOC	0.37±0.02	0.46±0.08	0.46±0.09	0.50±0.04	0.45±0.01
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	216.39±10.34	224.87±24.50	225.54±24.06	229.88±16.74	228.41±24.24
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	23.45±1.44	22.05±1.42	26.66±2.10	23.19±2.15	21.47±1.21
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	3.48±0.13 ^a	1.26±0.13 ^b	1.22±0.12 ^b	1.58±0.24 ^b	1.54±0.27 ^b
血清 serum					
总抗氧化能力/(U/mL) T-AOC	1.47±0.04 ^b	1.64±0.16 ^a	1.68±0.08 ^a	1.70±0.08 ^a	1.77±0.05 ^a
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	30.47±3.81	36.60±4.61	32.33±4.36	33.35±3.19	31.00±3.83
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	2.51±0.03	2.82±0.03	2.89±0.02	2.53±0.02	2.55±0.04
丙二醛/(nmol/mL) MDA	24.71±1.39	24.51±2.40	23.53±2.31	22.29±1.93	21.46±1.60
肠道 intestine					
总抗氧化能力/(mmol/g prot) T-AOC	0.13±0.03 ^b	0.14±0.03 ^b	0.19±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a	0.17±0.00 ^{ab}
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	37.88±0.70 ^b	42.35±0.83 ^{ab}	45.70±0.86 ^a	46.59±0.91 ^a	42.05±0.93 ^{ab}
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	2.48±0.29	3.31±0.25	3.38±0.33	2.78±0.22	2.70±0.06
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	10.22±0.69	9.18±0.68	8.98±0.85	9.05±0.04	8.90±0.13

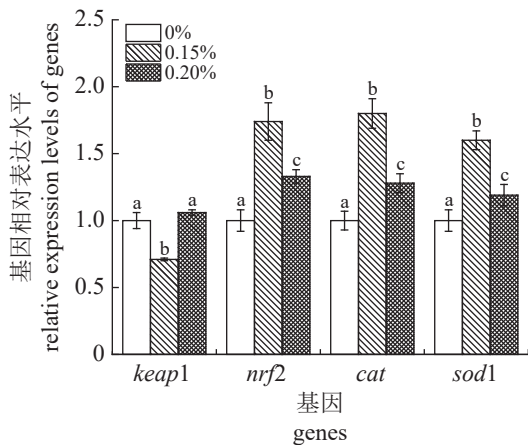


图 2 酸化剂对大口黑鲈肠道抗氧化相关基因表达的影响
不同小写字母表示同一基因不同添加量之间差异显著, $P < 0.05$, 下同。

Fig. 2 Effects of dietary acidifier on expression of antioxidant-related genes in intestine of *M. salmoides*

In the same gene, values with different superscripts are significantly different between different additive amount ($P < 0.05$), the same below.

提高而逐渐升高, 在 0.15% 组达到最大 ($P < 0.05$)。整体而言, 当饲料中酸化剂添加水平为 0.15% 时, 增加了大口黑鲈肠道绒毛长度、宽度和肌层厚度。饲料添加 0.20% 的酸化剂时, 尽管肠道形态指标与 0.15% 无显著差异, 但均呈现下降趋势 ($P > 0.05$)。

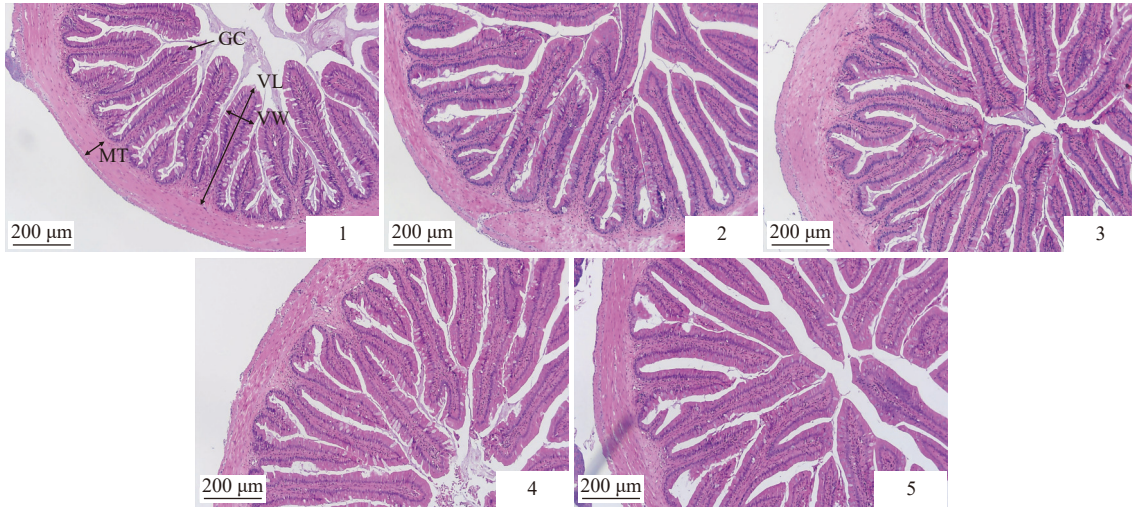
2.8 酸化剂对大口黑鲈肠道炎症相关基因表达的影响

大口黑鲈肠道炎症相关基因 (*tnf-α*、*il-1β*、*il-10* 和 *tgf-β1*) 的 mRNA 表达水平结果显示, 与对照组相比, 0.20% 组大口黑鲈肠道 *tnf-α* 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。饲料添加 0.15%~0.20% 酸化剂显著降低了 *il-1β* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 添加 0.15% 酸化剂显著提高了 *il-10* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。酸化剂对大口黑鲈肠道 *tgf-β1* 表达水平无显著影响 ($P > 0.05$) (图 3)。

3 讨论

3.1 酸化剂对大口黑鲈生长性能的影响

在本研究中, 当饲料中酸化剂的添加水平为 0.15% 时, 大口黑鲈的终末均重、增重率和特定生长率均达到最大值。随着饲料中酸化剂添加水平的提高, 增重率和特定生长率呈现下降的趋势。因此, 适宜水平的酸化剂 (0.15%) 可以提高大口黑鲈的生长性能。以增重率为评价指标进行折线模型拟合, 实验表明, 大口黑鲈饲料中酸化剂的适宜添加量为 0.152%。本研究结果与饲料添加酸化剂对尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[29]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[14, 21] 和卵形鲳鲆 (*Trachinotus ova-*



图版 酸化剂对大口黑鲈肠道组织学的影响

1. 0% 组, 2. 0.05% 组, 3. 0.10% 组, 4. 0.15% 组, 5. 0.20% 组; H.E 染色, 100×; GC. 杯状细胞, MT. 肌层厚度, VL. 绒毛长度, VW. 绒毛宽度。

Plate Effect of dietary acidifier on the intestinal morphology of *M. salmoides*

1. group 0%, 2. group 0.05%, 3. group 0.10%, 4. group 0.15%, 5. group 0.20%; H.E, 100×; GC. goblet cell, MT. muscular thickness, VL. villi length, VW. villi width.

表 9 酸化剂对大口黑鲈肠道形态指标的影响

Tab. 9 Effect of dietary acidifier on the intestinal morphology indices of *M. salmoides*

指标 indices	组别 groups				
	0%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
肌层厚度 muscle thickness	88.45±6.29 ^b	90.74±15.62 ^{ab}	100.87±3.78 ^a	103.06±5.80 ^a	102.96±7.08 ^a
绒毛长度 villus length	484.80±58.06 ^b	525.17±66.63 ^b	583.97±90.02 ^{ab}	682.01±74.22 ^a	672.65±74.33 ^a
绒毛宽度 villus width	113.95±6.60 ^b	115.87±6.69 ^{ab}	121.80±9.27 ^{ab}	129.61±10.49 ^a	125.98±10.41 ^{ab}

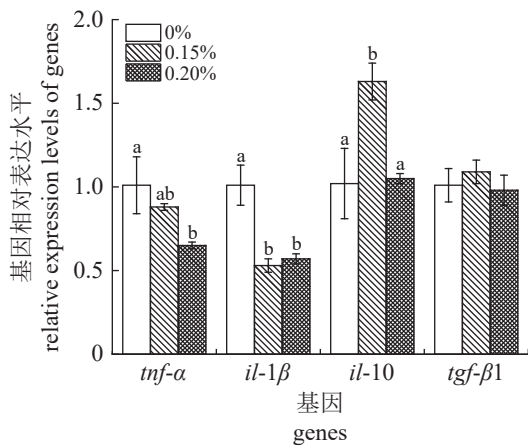


图 3 酸化剂对大口黑鲈肠道炎症相关细胞因子基因表达的影响

Fig. 3 Effects of dietary acidifier on the gene expression of inflammatory cytokines in intestine of *M. salmoides*

us)^[22] 的促生长作用一致。饲料中添加适量酸化剂 (0.15%) 可显著提高蛋白质效率和脂肪效率, 降低饲料系数, 提高饲料利用率, 这可能是大口黑鲈体重增加的原因之一。以饲料系数为评价指标进行折线模型拟合, 实验发现, 大口黑鲈饲料中酸化剂的适宜添加量为 0.148%。本实验中, 饲料添加酸化剂显著影响了蛋白质和脂肪的沉积率, 表明饲料酸化剂可以通过提高大口黑鲈鱼体蛋白质和脂肪沉积而促进大口黑鲈生长。

在尼罗罗非鱼^[32] 和大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[33] 的实验中, 未发现营养物质消化率因饲料中添加二甲酸盐 (酸化剂) 而改善。在鲫 (*Carassius auratus*)^[34] 饲料中添加 0.25% 的丁酸钠 (酸化剂), 发现提高了干物质和粗蛋白的消化率, 表明饲料添加酸化剂对不同水生动物消化率的影响存在较大差异。在本实验中, 饲料中添加 0.10%~0.15% 的酸化剂显著提高了大口黑鲈对干物质、粗脂肪

和总能量的表观消化率, 表明酸化剂可以通过提高大口黑鲈对脂肪和能量的消化能力来提高大口黑鲈的生长性能。消化酶活性直接与消化能力相关, 并影响鱼类的生长性能^[35]。与对照组相比, 饲料中添加 0.15%~0.20% 的酸化剂显著提高了肠道脂肪酶活性。在眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[36]、里海鳟 (*S. trutta caspius*)^[16] 中也发现类似的结果。综上所述, 饲喂添加 0.15% 的酸化剂通过提高大口黑鲈消化酶活性, 促进对营养物质的消化能力, 从而提高了大口黑鲈的生长性能。

3.2 酸化剂对大口黑鲈血清生化指标的影响

血清生化指标可以反映出机体各组织器官的功能和机体营养代谢情况, 从而间接反映动物的健康状况^[37]。血清 TP 和 ALB 含量反映了鱼体免疫和健康的状况^[38]。饲料中添加二甲酸能够显著提高尼罗罗非鱼和舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 血清中 TP 和 ALB 含量^[14,27], 而对鲤 (*Cyprinus carpio*)^[39] 血清中 TP 和 ALB 没有影响。在本实验中, 饲料中添加酸化剂对大口黑鲈的血清 TP 和 ALB 无显著影响, 表明饲料添加酸化剂对不同水生动物血清免疫反应的影响存在差异。T-CHO 和 TG 含量与肝脏脂质代谢密切相关^[40], HDL-C 将肝脏外胆固醇转运至肝脏, LDL-C 将肝脏内胆固醇转运至血液, 二者在血液中的含量变化反映脂质转运状况^[41]。在本实验中, 与对照组相比, 饲料中分别添加 0.15% 的酸化剂, 血清 TG 和 TC 含量显著降低, HDL-C 含量显著升高, 表明在饲料中添加酸化剂可能调节了大口黑鲈肝脏脂质代谢和转运状况, 其具体机制有待进一步研究。

血清 AST 和 ALT 是两种重要的转氨酶, 是反映动物肝脏损伤的重要指标^[42]。在正常状态下, 组织中少量的转氨酶进入血清, 血清中 AST 和 ALT 的活性维持在较低的水平, 但当肝脏组织细胞发生破坏和损伤时, 肝细胞中的 AST 和 ALT 大量释放至血清中, 引起血清内转氨酶活性增强^[43]。在本研究中, 饲喂添加酸化剂饲料的大口黑鲈血清中 AST 活性显著下降, 说明饲料中添加酸化剂对大口黑鲈的肝脏具有一定的保护作用。以血清生化指标为衡量标准, 推荐大口黑鲈饲料中酸化剂水平在 0.05%~0.20% 为宜。

3.3 酸化剂对大口黑鲈抗氧化性能的影响

T-AOC、CAT 和 SOD 抗氧化酶活性会受到鱼类营养状况的影响, 抗氧化能力对于保护生物

体免受自由基和非特异性免疫具有重要意义^[44-45]。自由基在 SOD 的作用下转化为分子氧和过氧化氢, CAT 催化过氧化氢进一步分解为水和分子氧, 从而清除自由基, 减少脂质过氧化物损伤。MDA 是脂质过氧化产物, 与动物的健康密切相关^[46-48]。与尼罗罗非鱼^[14]、卵形鲳鲹^[22] 的研究相似, 在本研究中饲喂添加酸化剂饲料的大口黑鲈显示出比对照饲料更好的 T-AOC、SOD、CAT 活性和更低的 MDA 含量, 表明饲料添加酸化剂可以提高大口黑鲈的抗氧化能力。

鱼类肠道易受氧化应激的影响, 抗氧化能力的提高会改善肠道的功能^[49]。鱼体多种抗氧化基因的转录调控主要是由 Keap1/Nrf2 信号通路介导的^[50]。Nrf2 是抗氧化系统的关键组成部分^[51], 在正常生理状态下 Nrf2 与细胞质中的 Keap1 结合而被抑制。当受到刺激时, Nrf2 与 Keap1 分离, Nrf2 被释放出来后转移到细胞核, 激活下游基因的转录, 从而调节抗氧化酶的表达^[52]。本研究中, 饲料中添加适量的酸化剂上调了肠道 *nrf2* 基因表达, 下调了肠道 *keap1* 基因表达, 表明酸化剂可活化大口黑鲈的 Keap1/Nrf2 信号通路来调控下游基因表达。此外, 饲料中添加 0.15% 的酸化剂上调了大口黑鲈肠道 *sod1* 和 *cat* 基因表达, 这与肠道 SOD 和 CAT 活性随酸化剂添加水平变化的趋势是一致的。综上所述, 饲料添加酸化剂可能通过 Keap1/Nrf2 信号通路来提高 *sod1* 和 *cat* 的表达, 从而提高大口黑鲈的抗氧化能力。

3.4 酸化剂对大口黑鲈肠道健康的影响

肠道是吸收营养的主要器官^[53]。形态学指标反映鱼类肠道的发育和健康程度, 与肠道的消化吸收能力相关^[54]。分布于消化道上皮中的杯状细胞, 是一种典型的黏液分泌细胞, 可以分泌黏液协助消化^[55-56]。在本实验中, 肠道组织形态学观察发现, 酸化剂的添加会改变大口黑鲈肠道组织形态结构。饲料中添加适量的酸化剂会增加前肠杯状细胞数量, 表明酸化剂可以通过增加肠道杯状细胞数量来提高大口黑鲈的消化能力。此外, 随着饲料中酸化剂水平的提高, 大口黑鲈前肠绒毛长度、绒毛宽度和肌层厚度均呈现先上升后下降的趋势, 其中 0.15% 酸化剂组较对照组大口黑鲈前肠肌层厚度、肠道绒毛长度和宽度都有显著增加。在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的实验发现, 二甲酸盐促进肠道绒毛生长, 并提高杯状细胞数

量^[57]。这种对肠道的正面影响可以促进消化酶的分泌和营养物质的消化, 促进黏膜对营养物质的吸收, 从而改善鱼类的生长性能^[3, 58]。

肠黏膜的先天免疫功能与细胞因子介导的炎症反应密切相关^[59]。抑制促炎细胞因子(如 *tnf-α* 和 *il-1β*) 以及增加抗炎细胞因子(如 *il-10* 和 *tgf-β1*) 的表达能降低鱼类的炎症水平, 提高抗炎能力^[60]。本研究中, 饲料中添加适量的酸化剂可显著下调大口黑鲈肠道促炎细胞因子 *tnf-α* 和 *il-1β* 基因表达, 同时上调抗炎细胞因子 *il-10* 基因表达, 表明酸化剂能够降低大口黑鲈肠道炎症水平。综上, 饲料添加 0.15% 酸化剂能够提高大口黑鲈的免疫力。

4 结论

饲料中添加酸化剂能够通过提高大口黑鲈的消化能力, 促进其生长性能。此外, 酸化剂能够降低肠道炎症水平, 并通过 Keap1/Nrf2 信号通路提高大口黑鲈的抗氧化能力, 维持肠道健康。综上, 推荐大口黑鲈饲料中酸化剂添加水平为 0.148%~0.152%。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] FAO. 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022[R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [2] Hoseinifar S H, Sun Y Z, Caipang C M. Short - chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1380-1391.
- [3] Dawood M A O, Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 243-251.
- [4] Tang Y Y, Lou X Y, Yang G X, *et al.* Occurrence and human health risk assessment of antibiotics in cultured fish from 19 provinces in China[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 964283.
- [5] Santos L, Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(2): 135-143.
- [6] Carbone D, Faggio C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 172-178.
- [7] Da Silva B C, do Nascimento Vieira F, Mouriño J L P, *et al.* Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(2): 612-623.
- [8] Lückstädt C. The use of acidifiers in fish nutrition[J]. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2008, 3(044).
- [9] Ng W K, Koh C B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 9(4): 342-368.
- [10] Vielma J, Lall S P. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 1997, 3(4): 265-268.
- [11] Hoseinifar S H, Dadar M, Ringø E. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(8): 3987-4000.
- [12] Sotoudeh E, Sangari M, Bagheri D, *et al.* Dietary organic acid salts mitigate plant protein induced inflammatory response and improve humoral immunity, antioxidative status and digestive enzyme activities in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(5): 1669-1680.
- [13] Badzohreh G, Zarei S, Davoodi R, *et al.* Effects of different levels of dietary butyric acid on some growth performance, immunity and digestive enzymes activity of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus* Houuttuyn, 1782)[J]. *Aquatic Animals Nutrition*, 2020, 6(3): 55-67.
- [14] Hassaan M S, El-Sayed A M I, Mohammady E Y, *et al.* Eubiotic effect of a dietary potassium diformate (KDF) and probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on growth, hemato-biochemical indices, antioxidant status and intestinal functional topography of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed diet free fishmeal[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736147.
- [15] Zhao H X, Peng K, Wang G X, *et al.* Metabolic changes, antioxidant status, immune response and resistance to ammonia stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus*

- fulvidraco*) fed diet supplemented with sodium butyrate[J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736441.
- [16] Mohammadian T, Momeni H, Mesbah M, *et al.* Effect of different levels of dietary acidifier “sodium diformate” on the innate immune system and expression of growth and immunological related genes in *Salmo trutta caspius*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(6): 2074-2085.
- [17] Safari R, Hoseinifar S H, Kavandi M. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate[J]. *Fish physiology and biochemistry*, 2016, 42(6): 1733-1739.
- [18] Wu P, Tian L, Zhou X Q, *et al.* Sodium butyrate enhanced physical barrier function referring to Nrf2, JNK and MLCK signaling pathways in the intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 121-132.
- [19] Chen W J, Chang K, Chen J L, *et al.* Dietary sodium butyrate supplementation attenuates intestinal inflammatory response and improves gut microbiota composition in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed with a high soybean meal diet[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(6): 1805-1819.
- [20] Fang L, Wang Q, Guo X Z, *et al.* Effects of dietary sodium butyrate on growth performance, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and immune response in juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus* Pengze)[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100828.
- [21] Reda R M, Mahmoud R, Selim K M, *et al.* Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 255-262.
- [22] Xun P W, Zhou C P, Huang X L, *et al.* Effects of dietary potassium diformate on growth performance, fillet quality, plasma indices, intestinal morphology and liver health of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 24: 101110.
- [23] Jobling M. National Research Council (NRC): nutrient requirements of fish and shrimp[J]. *Aquaculture International*, 2012, 20(3): 601-602.
- [24] Zhang H L, Yi L N, Sun R J, *et al.* Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets[J]. *Aquaculture*, 2016, 453: 147-153.
- [25] Lückstädt C, Kühlmann K J. The use of diformates in tilapia-ways to improve performance sustainably[J]. *INFOFISH International*, 2011(2): 22-25.
- [26] Wassef E A, Abdel-Momen S A G, Saleh N E S, *et al.* Is sodium diformate a beneficial feed supplement for European seabass (*Dicentrarchus labrax*)? Effect on growth performance and health status[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2017, 43(3): 229-234.
- [27] Wassef E A, Saleh N E, Ashry A M. Effects of taurine or sodium diformate supplementation to a low fishmeal plant - based diet fed to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(4): 1513-1524.
- [28] Reda R M, El-Murr A, Abd Elhakim Y, *et al.* *Aeromonas veronii* detection in Egyptian fish farms with summer tilapia mortality outbreaks and the role of formic acid in limiting its spread[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(3): 940-956.
- [29] Reyshari A, Mohammadiazarm H, Mohammadian T, *et al.* Effects of sodium diformate on growth performance, gut microflora, digestive enzymes and innate immunological parameters of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25(5): 1135-1144.
- [30] 刘昕. 低鱼粉饲料中添加茶树精油对大口黑鲈生长性能和生理健康的影响 [D]. 湖北: 长江大学, 2023.
- Liu X. Effects of tea tree essential oil supplementation in low fish meal diet on growth performance and physiological health of largemouth bass, *Micropterus salmoides*[D]. Hubei: Yangtze University, 2023. (in Chinese)
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [32] Ng W K, Koh C B, Sudesh K, *et al.* Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. , and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(13): 1490-1500.

- [33] Morken T, Kraugerud O F, Sørensen M, *et al.* Effects of feed processing conditions and acid salts on nutrient digestibility and physical quality of soy-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(1): 21-34.
- [34] 孙浪, 刘臻, 郝光, 等. 丁酸钠对鲫鱼生长和肠细胞增殖的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 893-901. Sun L, Liu Z, Hao G, *et al.* Effects of sodium butyrate on growth and intestinal cell proliferation of *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 893-901. (in Chinese)
- [35] Krogdahl Å, Bakke-McKellep A M. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 141(4): 450-460.
- [36] Castillo S, Rosales M, Pohlenz C, *et al.* Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 6-12.
- [37] Jesus G F A, Pereira S A, Owatari M S, *et al.* Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period[J]. *Aquaculture*, 2019, 504: 326-333.
- [38] Uribe C, Folch H, Enríquez R, *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review[J]. *Veterinárni medicína*, 2011, 56(10): 486-503.
- [39] Krome C, Schuele F, Jauncey K, *et al.* Influence of a sodium formate/formic acid mixture on growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) fed different fishmeal replacement levels of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in practical, mixed diets[J]. *Journal of Applied Aquaculture*, 2018, 30(2): 137-156.
- [40] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1628-1638. Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1628-1638. (in Chinese)
- [41] Rosenson R S. Low HDL-C: a secondary target of dyslipidemia therapy[J]. *The American Journal of Medicine*, 2005, 118(10): 1067-1077.
- [42] Mirghaed A T, Ghelichpour M, Hoseini S M, *et al.* Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(4): 1143-1151.
- [43] Nyblom H, Berggren U, Balldin J, *et al.* High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking[J]. *Alcohol and alcoholism*, 2004, 39(4): 336-339.
- [44] Yang C Y, Du X D, Hao R J, *et al.* Effect of vitamin D₃ on immunity and antioxidant capacity of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* after transplantation: insights from LC-MS-based metabolomics analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 271-279.
- [45] Yang C Y, Hao R J, Du X D, *et al.* Response to different dietary carbohydrate and protein levels of pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) as revealed by GC-TOF/MS-based metabolomics[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 650: 2614-2623.
- [46] Li W F, Zhang X P, Song W H, *et al.* Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(6): 1585-1592.
- [47] Atli G, Canli E G, Eroglu A, *et al.* Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2016, 126: 30-37.
- [48] Jiang W D, Wu P, Tang R J, *et al.* Nutritive values, flavor amino acids, healthcare fatty acids and flesh quality improved by manganese referring to up-regulating the antioxidant capacity and signaling molecules TOR and Nrf2 in the muscle of fish[J]. *Food Research International*, 2016, 89: 670-678.
- [49] Wu J H, Xu C, Shan C Y, *et al.* Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*[J]. *Life Sciences*, 2006, 78(6): 622-630.
- [50] Yu Y B, Wang C H, Wang A, M *et al.* Effects of various feeding patterns of *Bacillus coagulans* on growth performance, antioxidant response and Nrf2-Keap1 signaling pathway in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 75-83.
- [51] Habte-Tsion H M, Ren M C, Liu B, *et al.* Threonine modulates immune response, antioxidant status and gene expressions of antioxidant enzymes and antioxidant-immune-cytokine-related signaling molecules in juven-

- ile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 189-199.
- [52] Nguyen T, Yang C S, Pickett C B. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37(4): 433-441.
- [53] Onura C N, Van Den Broeck W, Nevejan N, *et al.* Growth performance and intestinal morphology of African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) larvae fed on live and dry feeds[J]. *Aquaculture*, 2018, 489: 70-79.
- [54] Liu W S, Yang Y N, Zhang J L, *et al.* Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112(1): 15-29.
- [55] Leknes I L. Mucin in epithelial cells in oesophagus and stomach of black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Teleostei)[J]. *Zoomorphology*, 2015, 134(2): 269-277.
- [56] 曾端, 叶元土. 鱼类食性与消化系统结构的研究 [J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(4): 361-364.
- Zeng D, Ye Y T. Studies on digestive system and different feeding habits of some fishes in fresh water[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1998, 20(4): 361-364. (in Chinese)
- [57] Farsani M N, Gorji S B, Hoseinifar S H, *et al.* Combined and singular effects of dietary PrimaLac® and potassium diformate (KDF) on growth performance and some physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(1): 236-245.
- [58] Pereira S A, Oliveira H M, Jesus G F A, *et al.* Can the minerals calcium and sodium, chelated to propionic acid, influence the health and zootechnical parameters of native silver catfish *Rhamdia quelen*?[J]. *Aquaculture*, 2018, 496: 88-95.
- [59] 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.
- [60] Wang T H, Secombes C J. The cytokine networks of adaptive immunity in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1703-1718.

Effects of dietary acidifier on growth, antioxidant capacity and intestinal health of *Micropterus salmoides*

HE Jiaxin¹, YANG Tingting¹, GUO Kai², GUAN Shu³,
GAO Weihua^{1*}, LUO Kai^{1*}, CHI Shuyan⁴

(1. Hubei Key Laboratory of Waterlogging Disaster and Agricultural Use of Wetland,
Yangtze University, Jingzhou 434024, China;

2. Animal Nutrition and Health Department, DSM (China) Co., Ltd., Shanghai 200020, China;

3. DSM Greater Asia Pacific Department of Animal Nutrition and Health, Singapore 159471;

4. Guangdong South China Sea Key Laboratory of Aquaculture for Aquatic Economic Animals,
Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to explore the effects of dietary acidifiers on the growth, antioxidant indices and intestinal health of *Micropterus salmoides*, five isonitrogenous and isolipid diets containing different levels of acidifiers (0%, 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20%) were fed to *M. salmoides* with an initial body weight of (21.31±0.18) g for 64 days. The results showed that the weight gain rate and specific growth rate of largemouth bass increased first and then decreased with the increase of dietary acidifier level, and reached the maximum value in the 0.15% group. Compared with the control group, supplementing 0.10%-0.15% of dietary acidifiers significantly decreased feed conversion ratio, and significantly increased whole-body crude lipid content and protein deposition rate. The apparent digestibility of dry matter and gross energy of *M. salmoides* were significantly increased by dietary acidifiers ($P<0.05$). The intestinal lipase activity of *M. salmoides* was significantly higher than that of the control group after 0.15% of dietary acidifier ($P<0.05$). Compared with the control group, the triglyceride content and the total cholesterol content in the 0.15% group were significantly increased, and the high-density lipoprotein cholesterol content in the 0.15% group was significantly increased ($P<0.05$). Serum total antioxidant capacity, intestinal total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity of *M. salmoides* were significantly increased ($P<0.05$), and serum aspartate aminotransferase activity and liver malondialdehyde content were significantly decreased by addition of 0.10%-0.15% of dietary acidifier ($P<0.05$). The villus length, villus width and muscularis thickness in 0.15% group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Compared with the control group, supplementation of 0.15% of dietary acidifiers significantly up-regulated the mRNA expression levels of antioxidant related genes (*nrf2*, *cat* and *sod1*) ($P<0.05$), and significantly down-regulated the mRNA expression level of anti-inflammatory factor (*il-10*) gene ($P<0.05$). Supplementation of 0.20% of dietary acidifier significantly down-regulated the mRNA expression levels of pro-inflammatory factors (*tnf- α* and *il-1 β*) genes ($P<0.05$). The results of the broken line model based on the weight gain rate and feed conversion ratio showed that the appropriate supplemental amount of acidifier in the diet of *M. salmoides* was 0.148%-0.152%. In conclusion, supplementation with 0.15% dietary acidifier could promote the growth and antioxidant capacity of *M. salmoides*, reduce intestinal inflammation level and maintain intestinal health.

Key words: *Micropterus salmoides*; acidifier; growth performance; antioxidant indices; intestinal health

Corresponding authors: GAO Weihua. E-mail: gaoweihua@yangzeu.edu.cn;

LUO Kai. E-mail: luokaikmt@163.com

Funding projects: Research and Development Program in Key Areas of Guangdong Province (2021B0202050002); Natural Science Foundation of Hubei Province (2023AFB174)