

载铜蒙脱石对尼罗罗非鱼肠道菌群和消化机能的影响

胡彩虹¹ 徐勇¹ 熊莉¹ 夏枚生² 许梓荣¹

(1. 浙江大学动物科学学院, 动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029; 2. 浙江大学地球科学系, 杭州 310027)

摘要: 本试验研究了饲料中添加 0.10%、0.15%、0.20% 载铜蒙脱石对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肠道菌群和消化机能的影响。结果显示, 载铜蒙脱石显著降低了肠道细菌数量, 明显改变了肠道菌群的组成, 使气单胞菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、不动杆菌属、产碱菌属、肠杆菌科、弧菌属的百分比减少。与对照组相比, 饲料中添加 0.10%、0.15% 和 0.20% 载铜蒙脱石分别使干物质消化率显著提高了 6.43%、8.47% 和 8.83% ($p < 0.05$), 粗蛋白消化率显著提高了 5.63%、6.24% 和 6.91% ($p < 0.05$), 粗脂肪消化率显著提高了 4.62%、5.65% 和 5.98% ($p < 0.05$), 添加 0.15% 和 0.20% 载铜蒙脱石使粗灰分消化率显著提高了 18.77% 和 15.09% ($p < 0.05$)。添加载铜蒙脱石显著提高了肠组织蛋白酶活性 ($p < 0.05$), 且 0.15% 和 0.20% 载铜蒙脱石显著提高了肠组织淀粉酶和脂肪酶活性 ($p < 0.05$)。载铜蒙脱石显著提高了前肠、中肠、后肠绒毛和微绒毛高度。结果提示, 载铜蒙脱石在鱼体内具有较强的抗菌活性, 能有效抑制肠道病原菌的增殖, 保护肠粘膜免受病原菌的侵袭, 使肠粘膜始终处于健康状态, 以益于消化酶的分泌和饲料养分的消化。

关键词: 载铜蒙脱石; 肠道菌群; 消化机能; 尼罗罗非鱼

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)06-0881-08

长期使用抗生素和抗菌药物, 造成诸如细菌抗药性、耐药基因转移、水产品中药物残留等不良后果, 直接或间接威胁人类健康, 而且由于长期滥用抗生素引起水环境污染, 导致养殖环境恶化, 生态平衡失调。因此, 研制新型的抗菌材料已迫在眉睫。

采用无机材料为载体, 掺入抗菌金属离子而制成的金属系无机抗菌材料, 具有抗菌谱广、细菌不易产生耐药性、使用安全等特点, 引起了人们的极大关注^[1]。蒙脱石是一种双八面体层状结构的天然纳米铝硅酸盐矿物, 在由硅氧四面体和八面体组成的结构层之间, 是易于被取代的水合阳离子层, 易于被其他阳离子或功能团所置换。我们通过吸附、离子交换反应把抗菌性铜离子植入蒙脱石晶格, 制成载铜蒙脱石, 并使蒙脱石在搭载铜离子后表面剩余正电荷, 从而提高其吸附带负电荷的细菌的能力; 另一方面, 利用蒙脱石巨大的比表面积及其缓释效应, 通过抗菌性铜离子的溶出兼有杀灭细菌的作用^[2,3]。体外抗菌实验表明, 载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌均有较强的抗菌活性^[2,3]。载铜蒙脱石可有效阻断嗜水气单胞菌粘附罗非鱼鳃上皮、皮肤上皮、肠上皮细胞, 并显

著降低嗜水气单胞菌粘附上皮细胞造成的细胞膜损伤^[4], 这可望将载铜蒙脱石作为饲料添加剂用于水产动物的杀菌和保健。本实验研究了载铜蒙脱石对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肠道菌群和消化机能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料 载铜蒙脱石 (Copper-bearing montmorillonite, Cu-MMT): 内蒙古赤峰的钙基蒙脱石和硫酸铜为主要原料, 采用液相离子交换法制备载铜蒙脱石^[2-4]。原矿钙基蒙脱石含量大于 95%, 经分离提纯后其化学式为 $[Na_{0.158}K_{0.082}Ca_{0.256}Mg_{0.063}][Mg_{0.376}Fe_{0.014}^{2+}Fe_{0.136}^{3+}Al_{0.474}][Si_{0.87}Al_{0.13}]O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$ 。制备的载铜蒙脱石中铜的质量分数为 2.0%, 阳离子交换容量为 1.45 mol(+)/kg BET 比表面积为 305.7 m²/g。尼罗罗非鱼: 由浙江武义水产良种场提供, 为尼罗罗非鱼吉福品系。试验饲料: 参考罗非鱼的营养需求 (NRC, 1993)^[5] 设计, 基础饲料组成及营养组成 (表 1)。各种原料经超微粉碎后按比例混合均匀, 用绞肉机挤压成粒径 0.2cm 的湿颗粒。置于 50℃ 烘箱中烘干。

收稿日期: 2006-08-29 修订日期: 2008-02-01

通讯作者: 胡彩虹 (1972-), 女, 浙江东阳人; 副研; 主要从事动物营养学研究。Tel 0571-86985607 E-mail chhu@zju.edu.cn

表 1 基础饲料配方及营养组成

Tab. 1 Ingredients and nutrient composition of diets

组分 Ingredients	%	营养组成 Nutrition composition	%
鱼粉 Fish meal	10	总能 Gross energy (kJ/g)	18.1
豆粕 Soybean meal	30	粗蛋白 Crude protein	35.2
菜粕 Rapeseed meal	25	粗脂肪 Crude lipid	2.5
次粉 Wheat middlings	26	粗纤维 Fibre	6.8
玉米油 Corn oil	2	灰分 Ash	11.1
复合维生素 Vitamin premix ¹	1		
复合矿物质 Mineral premix ²	5		
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose	1		

1 复合维生素 (mg/kg 饲料): 维生素 B₁, 10 核黄素, 20 维生素 B₆, 10 维生素 B₁₂, 2 维生素 A, 4 维生素 D₃, 0.4 维生素 K₁, 80 叶酸, 5 泛酸钙, 40 肌醇, 400 烟酸, 150 维生素 E, 60 胆碱, 6000 维生素 C, 500 2 复合矿物质 (g/kg 饲料): 氯化钠, 0.25; 硫酸镁, 3.75; 磷酸二氢钾, 8 磷酸二氢钙, 5; 硫酸亚铁, 0.72 乳酸钙, 0.88 硫酸锌, 0.088; 硫酸锰, 0.040 硫酸铜, 0.008 氯化钴, 0.00025 碘酸钾, 0.00075

1 Vitamin premix (mg/kg of diet): thiamine 10, riboflavin 20, pyridoxine 10, cobalamin 2, retinal 4, cholecalciferol 0.4, phylylquinone 80, folic acid 5, Calcium pantothenate 40, inositol 400, niacin 150, tocopherol 60, choline 6000, ascorbic acid 500, 2 Mineral premix (g/kg of diet): NaCl 0.25, MgSO₄ 3.75, KH₂PO₄ 8, Ca(H₂PO₄)₂ 5, FeSO₄ 0.72, (CH₂CHCOO)₂Ca·5H₂O 0.88, ZnSO₄·7H₂O 0.088, MnSO₄·4H₂O 0.040, CuSO₄·5H₂O 0.008, CoCl₂·6H₂O 0.00025, KIO₃·6H₂O 0.00075

1.2 饲养试验 采取单因子设计方案, 设计 4 个试验组, 分别在基础日粮中添加 0.10%、0.15% 和 0.20% 载铜蒙脱石, 每组设三个重复, 每个重复 30 尾。选取平均体重为 3.90g 左右的健康尼罗罗非鱼作为试验鱼, 暂养 14d 后称重, 随机分组, 试验期为 8 周。试验鱼在密闭式过滤循环系统的水族箱 (100cm × 50cm × 50cm) 中饲养, 每箱放养 30 尾。以充分曝气除氯后的自来水为水源, 每个水族箱配置一个 10 L/min 的滤清器, 水温为 25—28℃, ACO-318 型空气压缩机 24h 增氧, 水中溶解氧为 6.5—8.0 mg/L, pH 为 7.2—7.4。每天排污, 排水 1/3, 投喂的饲料以天平称重, 精确到 0.01 g。每天投喂 2 次, 每天 8:00 和 16:00 两次投喂。

1.3 消化试验 按表 1 饲料配方, 各组饲料中添加 0.5% C₂O₃ 作为指示剂, 逐级扩大均匀混合后压制成为 1.5mm 的颗粒饲料, 自然风干。饲养试验结束后, 每缸中随机选取 10 尾鱼, 用添加 0.5% C₂O₃ 的饲料饲喂, 试验前预饲一个星期。每天投料 1h 后收集粪便, 用带有洗耳球的长玻璃管吸取刚排出的完整、包膜的粪条至培养皿中, 于 50℃ 烘干备用, 连续收集一周。每箱的鱼粪混合均匀后称重, 作为分析样品。测定试验饲料和粪便的干物质、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和 C₂O₃ 含量, 计算饲料营养成分的表观消化率。以 C₂O₃ 为指示剂采用间接法测定消化率。

1.4 肠道菌群分析 饲养试验结束后, 停食 24h, 确保罗非鱼肠道呈空肠状态, 用 MS-222 麻醉剂麻

醉, 取出肠道, 用无菌生理盐水冲洗 3—5 次, 剪碎后以 1:4 加入无菌生理盐水匀浆, 制成原液。每个重复取 3 尾鱼。将肠壁原液作 10 倍系列梯度稀释, 取其中 3 个稀释度在淡水鱼类琼脂培养基 (FWA) 平板上涂布, 于 28—30℃ 下培养 24—48h 后计数, 并换算成 log₁₀CFU/克肠壁。在各组细菌的分离平板中, 选取菌落清晰、分散良好而且菌落数在 30—300 之间的平板, 每种菌落类型选取 3—5 个代表性菌落作为待测菌株, 接种在 FWA 斜面培养基上, 28℃ 培养 24—48h 后置 4℃ 冰箱中备用。细菌的鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6] 和《伯杰氏鉴定细菌学手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (第 9 版)^[7] 进行。

1.5 肝胰脏和肠组织消化酶测定 饲养试验结束, 停饲 24h 后, 用 MS-222 麻醉剂麻醉, 解剖取样。每箱取 5 尾, 解剖后取全肠段, 用 4℃ 的生理盐水 (0.85%) 洗去内容物, 用滤纸吸去组织样品表面水分, 装袋, 立即用液氮快速冷冻, 置 -20℃ 低温冰箱中保存。取解剖后的肝胰脏, 放入样品袋, 立即用液氮冷冻, 置 -20℃ 低温冰箱中保存。按叶继丹等^[8] 的方法进行。肝胰脏或肠组织在 4℃ 下解冻后, 剪碎, 称重, 按 10% 的组织样品重量比加入 4℃ 左右的 0.85% 生理盐水, 然后用组织匀浆器匀浆 5min, 20000 r/min 离心 15min, 取上清液, 置 4℃ 冰箱中保存, 8h 内测定完毕。测定肝胰脏、肠道蛋白酶活性时组织匀浆液分别稀释至 5% 和 1%。蛋白酶活性

定义为: 1g新鲜组织样品在 pH 7.6和 30℃条件下, 1min水解酪蛋白所产生的酪氨酸量 ($\mu\text{g/g}\cdot\text{min}$)。脂肪酶活性定义为: 1g新鲜组织样品在 pH 7.6和 30℃条件下, 1min水解脂肪所产生的脂肪酸量 ($\mu\text{g/g}\cdot\text{min}$)。淀粉酶活性定义为: 1g新鲜组织样品在 pH 7.6和 30℃条件下, 30min水解 10mg 淀粉为 1个单位 ($\text{mg/g}\cdot 30\text{min}$)。

1.6 肠组织切片的制作 分别剪取前、中、后肠各一小块约 0.5cm × 0.5cm大小, 立即用 4℃的生理盐水 (0.85%) 轻轻冲洗后平铺在滤纸上将液体吸干, 每段组织取两份, 一份立即放入 Bouin 氏液中固定, 备用做光镜切片; 另一份立即放入 2.5% 的戊二醛溶液中固定, 备用做电镜切片。光镜切片: 样品固定后, 仔细修整, 剪成 0.2—0.5cm 长的片段, 用德国 Leica 组织切片整套设备, 用一系列浓度梯度的乙醇脱水, 经二甲苯透明后, 用石蜡包埋、切片, 苏木精和伊红染色, 中性树胶封片。Leica Qwin 图像分析仪作定量分析。每个样品制作 3个非连续性的纵切片

和横切片, 每张纵切片测定 10个绒毛高度, 取其平均值作为一个测定数据。电镜切片: 样品固定后, 仔细修整成 2mm 大小, 用 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液清洗, 清洗后用一系列浓度梯度的乙醇和丙酮脱水, 经包埋剂浸透、包埋、聚合后, 制作超薄切片, 染色后在透射电镜上观察组织细胞的超微结构, 用 Leica Qwin 图像分析仪进行显微测量。

1.7 数据统计 各处理间平均值的比较采用一元方差分析, 差异显著者进行 Duncan's 多重比较, 结果以平均值 ± 标准差表示。计算程序采用 SAS (6.12) 中的一般线性模式 (General Linear Models Procedure) 进行。

2 结果

2.1 罗非鱼肠道菌群

肠道细菌数量 由表 2可见, 与对照组相比, 添加 0.10%、0.15% 和 0.20% 载铜蒙脱石使罗非鱼肠道细菌数量显著降低 ($p < 0.05$)。

表 2 载铜蒙脱石对罗非鱼肠道细菌数量的影响

Tab. 2 Effect of Cu-MMT on total aerobic bacterial counts of intestine of Nile tilapia (\log_{10} CFU per gram)

	Basal diet	0.10% Cu-MMT	0.15% Cu-MMT	0.20% Cu-MMT
肠道细菌数量 Intestinal total aerobic bacteria	6.47 ± 0.51 ^a	5.48 ± 0.63 ^b	5.25 ± 0.42 ^b	4.73 ± 0.46 ^b

注: 结果以平均数 ± 标准差表示, $n = 3$ 同一列中肩标字母不同者差异显著 ($p < 0.05$); 下同

Notes: Values are presented as means and standard deviations, $n = 3$ per treatment. Means with in a line with different letters shows significant difference ($p < 0.05$); The same as follows

肠道菌群组成 由表 3可见, 肠道优势菌群是气单胞菌属和肠杆菌科。载铜蒙脱石各组的优势菌群未发生改变, 但明显改变肠道菌群的组成, 使气单

胞菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、不动杆菌属、产碱菌属、肠杆菌科、弧菌属的百分比减少; 而芽胞杆菌属和棒杆菌属菌群增加。

表 3 载铜蒙脱石对罗非鱼肠道菌群组成的影响

Tab. 3 Effect of Cu-MMT on the composition of intestinal microflora of Nile tilapia (%)

	Basal diet	0.10% Cu-MMT	0.15% Cu-MMT	0.20% Cu-MMT
<i>Aer.</i>	40.2	36.8	33.5	30.6
<i>Pse.</i>	10.4	8.2	7.7	7.2
<i>Fla.</i>	9.8	5.2	5.6	4.6
<i>Aci.</i>	4.1	2.7	1.6	0
<i>Alc.</i>	6.6	3.5	2.3	2.7
<i>Ent.</i>	18.6	15.8	15.0	15.8
<i>Vib.</i>	5.3	3.9	4.1	3.7
<i>Bac.</i>	—	8.7	10.4	13.9
<i>Cor.</i>	—	7.3	10.8	12.1
<i>Mic.</i>	3.5	5.2	5.7	5.6
<i>Oth.</i>	1.5	2.7	3.8	3.3

注: “—” 示未检测到该菌 Not detected 气单胞菌属 (*Aer.*)、假单胞菌属 (*Pse.*)、黄杆菌属 (*Fla.*)、不动杆菌属 (*Aci.*)、产碱菌属 (*Alc.*)、肠杆菌科 (*Ent.*)、弧菌属 (*Vib.*)、芽胞杆菌属 (*Bac.*)、棒杆菌属 (*Cor.*)、微球菌属 (*Mic.*)、其他 (*Oth.*)

Note “—” Not detected *Aeromonas* (*Aer.*), *Pseudomonas* (*Pse.*), *Flavobacterium* (*Fla.*), *Acinetobacter* (*Aci.*), *Alcaligenes* (*Alc.*), *Enterobacteriaceae* (*Ent.*), *Vibrion* (*Vib.*), *Bacillus* (*Bac.*), *Corynebacterium* (*Cor.*), *Micrococcus* (*Mic.*), Other (*Oth.*)

2.2 饲料养分表观消化率

从表 4 可见, 与对照组相比, 饲料中添加 0. 10%、0. 15% 和 0. 20% 载铜蒙脱石分别使干物质消化率显著提高了 6. 43%、8. 47% 和 8. 83%, 粗蛋

白消化率显著提高了 5. 63%、6. 24% 和 6. 91%, 粗脂肪消化率显著提高了 4. 62%、5. 65% 和 5. 98%。添加 0. 15% 和 0. 20% 载铜蒙脱石使粗灰分消化率显著提高了 18. 77% 和 15. 09%。

表 4 载铜蒙脱石对饲料养分表观消化率的影响

Tab. 4 Effect of Cu-MMT on the apparent digestibilities of feed nutrients

	Basal diet	0. 10% Cu-MMT	0. 15% Cu-MMT	0. 20% Cu-MMT
干物质 Dry matter	62. 08±2. 07 ^b	66. 07±1. 08 ^a	67. 34±2. 43 ^a	67. 56±1. 63 ^a
粗蛋白 Crude protein	84. 19±1. 95 ^b	88. 93±2. 02 ^a	89. 44±1. 09 ^a	89. 17±2. 28 ^a
粗脂肪 Ether extract	82. 07±1. 24 ^b	85. 86±3. 12 ^a	86. 71±2. 37 ^a	86. 98±1. 41 ^a
粗灰分 Crude ash	21. 74±2. 08 ^b	24. 72±1. 94 ^{ab}	25. 82±2. 01 ^a	25. 02±1. 49 ^a

2.3 消化酶活性

由表 5 可见, 载铜蒙脱石对罗非鱼肝胰脏消化酶活性没有显著影响 ($p > 0. 05$)。与对照组相比, 饲料中添加 0. 10%、0. 15% 和 0. 20% 载铜蒙脱石显

著提高了肠组织蛋白酶活性 ($p < 0. 05$), 添加 0. 15% 和 0. 20% 载铜蒙脱石显著提高了肠组织淀粉酶和脂肪酶活性 ($p < 0. 05$)。

表 5 载铜蒙脱石对罗非鱼肝、胰脏和肠组织消化酶活性的影响

Tab. 5 Effect of Cu-MMT on the digestive enzyme activities in the hepatopancreas and intestine

	Basal diet	0. 10% Cu-MMT	0. 15% Cu-MMT	0. 20% Cu-MMT
肝胰脏 Hepatopancreas (U)				
蛋白酶 Protease	72. 19±5. 83	74. 31±6. 27	75. 09±8. 09	74. 98±5. 99
淀粉酶 Amylase	7. 18±0. 51	7. 89±0. 74	8. 09±0. 75	8. 11±0. 91
脂肪酶 Lipase	527. 06±49. 17	538. 19±46. 12	540. 91±41. 09	541. 04±57. 14
肠组织 Intestine (U)				
蛋白酶 Protease	1209. 4±108. 5 ^b	1509. 18±157. 03 ^a	1557. 7±141. 4 ^a	1542. 3±176. 9 ^a
淀粉酶 Amylase	10. 9±1. 3 ^b	13. 9±1. 2 ^{ab}	15. 4±1. 3 ^a	15. 6±1. 4 ^a
脂肪酶 Lipase	895. 7±119. 1 ^b	1131. 1±96. 3 ^{ab}	1245. 7±102. 9 ^a	1269. 0±138. 9 ^a

2.4 肠组织绒毛和微绒毛高度

由表 6 可见, 与对照组相比, 饲料中添加 0. 10%、0. 15% 和 0. 20% 载铜蒙脱石显著提高了前肠、中肠、后肠绒毛和微绒毛高度 ($p < 0. 05$)。同时

由图 1 和图 2 可见, 添加载铜蒙脱石后, 罗非鱼肠绒毛出现大量的横向分叉、明显长而致密; 微绒毛长而致密且均匀整齐。

表 6 载铜蒙脱石对罗非鱼各肠段绒毛和微绒毛高度的影响

Tab. 6 Effect of Cu-MMT on villus and microvillus heights at different regions of the intestinal tract

	Basal diet	0. 10% Cu-MMT	0. 15% Cu-MMT	0. 20% Cu-MMT
绒毛高度 Villus heights (μm)				
前肠 Foregut	350. 29±29. 07 ^b	428. 07±40. 72 ^a	435. 15±24. 16 ^a	437. 03±42. 45 ^a
中肠 Midgut	637. 04±38. 91 ^b	735. 81±49. 73 ^a	758. 68±60. 16 ^a	761. 94±55. 04 ^a
后肠 Hindgut	361. 37±18. 19 ^b	422. 13±28. 09 ^a	430. 81±32. 41 ^a	428. 16±40. 07 ^a
微绒毛高度 Microvillus heights (μm)				
前肠 Foregut	7. 24±0. 51 ^b	8. 38±0. 37 ^a	8. 53±0. 72 ^a	8. 61±0. 83 ^a
中肠 Midgut	7. 89±0. 45 ^c	9. 16±0. 74 ^{ab}	9. 84±0. 32 ^a	9. 81±0. 55 ^a
后肠 Hindgut	3. 56±0. 12 ^b	4. 37±0. 37 ^a	4. 49±0. 48 ^a	4. 52±0. 31 ^a

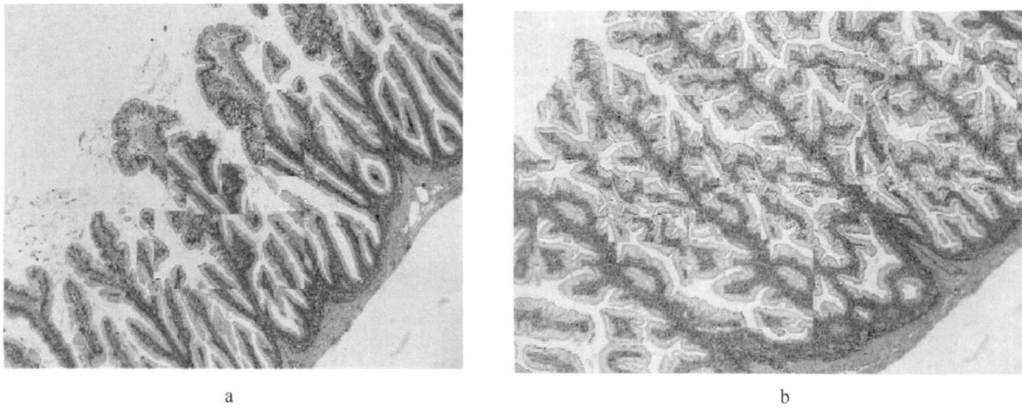


图1 罗非鱼中肠切片的光镜图(×70)
 Fig.1 The optical photo of midgut in Nile tilapia
 a. 对照组 Control ; b. 载铜蒙脱石组 Cu-MMT

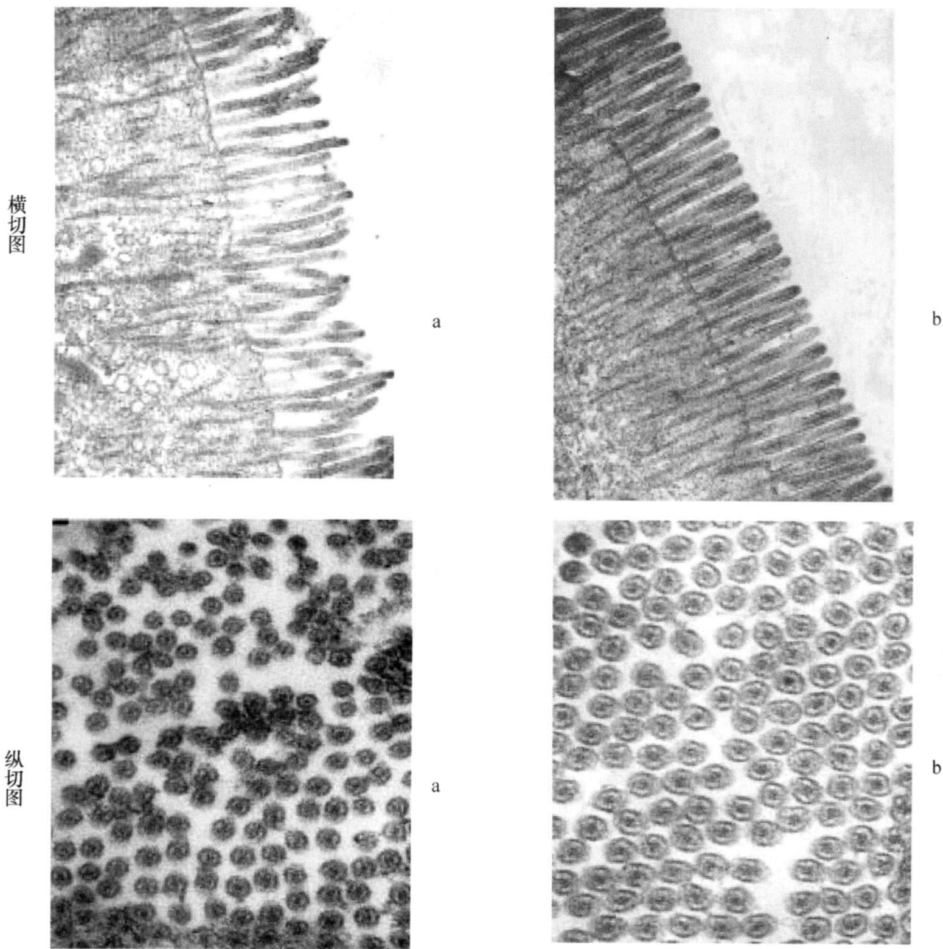


图2 罗非鱼中肠切片的电镜图(×20K)
 Fig.2 The SEM photo of midgut in Nile tilapia
 a. 对照组 Control ; b. 载铜蒙脱石组 Cu-MMT

3 讨论

3.1 肠道菌群的数量和组成

胡彩虹等^[2]研究表明,蒙脱石无抗菌作用,但载铜蒙脱石具有较强的抗菌作用,它对嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌的最小抑菌浓度分别为 150、150、75 mg/L,最小杀菌浓度分别为 600、600、300 mg/L。蒙脱石与细菌间的吸附作用分为物理吸附和化学吸附。蒙脱石、载铜蒙脱石、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌在 pH 为 6.0 时的 Zeta 电位分别为 -21 mV、11.8 mV、-18 mV、-16 mV、-22 mV。因此,蒙脱石与细菌间靠静电作用的化学吸附较弱,蒙脱石主要以物理吸附的形式与细菌发生作用。载铜蒙脱石所载铜主要以水合或复合阳离子形式进入蒙脱石层间,还有少量铜进入蒙脱石的微孔,进入层间和微孔的铜均可降低蒙脱石所带负电荷的密度,并可导致电价失衡,使之带正电荷,从而增大其与细菌间的静电吸附;细菌吸附到载铜蒙脱石表面后,表面富集的 Cu^{2+} 对其执行杀菌作用^[2,3]。因此,载铜蒙脱石的抗菌能力和两方面因素有关:一方面是其表面剩余正电荷能从介质中大量吸附表面带负电荷的细菌;另一方面是载铜蒙脱石释放至表面的铜离子直接作用于细菌,而不是先进入介质再作用于细菌,也就是说,载铜蒙脱石表面的有效铜离子浓度,大大高于它在介质中的实际浓度;载铜蒙脱石对细菌的抗菌效能,是静电吸附与铜离子杀菌能力协同作用的综合结果^[2,3]。本研究表明载铜蒙脱石显著降低罗非鱼肠道细菌数量,显然这与载铜蒙脱石的吸附、杀菌作用有关。

本试验发现,载铜蒙脱石使肠道菌群组成变化明显,基本趋势是抑制了革兰氏阴性菌的生长。分析原因可能是由于革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌细胞壁的结构不同的缘故^[9]。革兰氏阴性菌的细胞壁较革兰氏阳性菌薄,革兰氏阳性菌细胞壁所含的肽聚糖是革兰氏阴性菌的 3—20 倍^[9]。由于肽聚糖带负电荷,它可能会结合一部分由载铜蒙脱石溶出的 Cu^{2+} ,因此革兰氏阳性菌可以阻止更多的 Cu^{2+} 进入细胞质膜。而大部分 Cu^{2+} 可穿透革兰氏阴性菌的细胞壁到达质膜,发挥杀菌作用。郭彤^[10]研究了载铜蒙脱石对革兰氏阳性菌(嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌)和革兰氏阴性菌(大肠杆菌 K_{88} 和猪霍乱沙门氏菌)细胞壁的影响,发现在载铜蒙脱石作用后,大肠杆菌 K_{88} 和猪霍乱沙门氏菌细胞壁破坏,胞浆内容物浓缩,细胞质膜破坏,细胞形状由正常时的

杆状变为圆形、椭圆形和不规则形;而同一浓度的载铜蒙脱石与革兰氏阳性菌(嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌)作用后,细胞壁及细胞形态均未有大的改变。刘红柏等报道鲤鱼饲料中添加中草药后,明显改变了肠道菌群的数量和组成,气单胞菌属、假单胞菌属、弧菌属及肠杆菌科细菌数量明显下降,且试验组出现了对照组没有的芽孢杆菌属和棒杆菌属^[11]。另外,载铜蒙脱石对不同种类细菌的不同作用还与蒙脱石的特性有关。对思密达(主要成分为载铜蒙脱石)的药理研究表明,思密达只吸附、固定表面带有粒编码蛋白(CS31A)的致病性带电病原菌,对表面不带 CS31A 的正常菌群无固定清除作用^[12,13]。王俊侠等报道^[14],腹泻儿童服用思密达 5 d 后双歧杆菌数较治疗前增加 158 倍,患儿失调的肠道菌群趋向正常,重建了肠道菌群微生态平衡,阻止了外袭菌的定植,达到了治愈腹泻的目的。载铜蒙脱石选择性抗菌效果的作用机理有待于进一步探讨。

3.2 饲料养分表观消化率和消化酶活性

大量研究表明,鱼类消化道正常微生物菌群对鱼类分解、消化和吸收营养物质有着重要的作用^[15]。本试验中,载铜蒙脱石显著降低罗非鱼肠道细菌数量,使肠道菌群组成变化明显,载铜蒙脱石对肠道微生态的改善作用必然影响着消化酶活性和饲料养分的表观消化率。传统上蒙脱石常作为一种添加剂加入动物饲料以促进动物采食。研究表明在鸡和猪的日粮中添加蒙脱石(10—30 g/kg)可以有效增加饲料的转化率,提高动物的生长性能^[16,17]。同样载铜蒙脱石也可以通过提高罗非鱼的饲料养分表观消化率、消化酶活性和肠道屏障功能来促进罗非鱼的生长性能。Hu *et al.* 报道饲料添加 0.15% Cu-MMT 显著提高了罗非鱼的特定生长率、蛋白质效率、成活率和饲料转化率^[18]。

载铜蒙脱石影响罗非鱼消化机能还与蒙脱石的特性有关。已有研究表明,在饲料中添加蒙脱石能促进营养物质的消化^[19]。一般认为,蒙脱石对消化酶有以下影响:(1)蒙脱石的离子交换性能可改变胃肠道离子组成(包括微量元素),这些微量元素有促酶和催酶作用;(2)蒙脱石可延长食物通过消化道的的时间,因而使饲料的利用率得以提高。

3.3 肠组织形态

本试验研究发现,载铜蒙脱石使罗非鱼的肠绒毛和微绒毛高度均明显提高。肠粘膜结构的变化可反映肠道的健康状况。食糜中存在的应激原,因紧邻肠黏膜,能迅速影响肠黏膜形态。肠黏膜的形态

变化,如绒毛变短和凌乱都与病原菌、毒素的存在有关,绒毛变短减少了营养物质的吸收面积。粘附是细菌致病的先决条件,细菌通过粘附素和宿主细胞表面受体结合,然后在局部产生毒素或侵入深部组织致病;阻断病原菌粘附,可有效防治细菌感染和细菌移位^[20]。胡彩虹等^[4]报道载铜蒙脱石可显著降低嗜水气单胞菌对肠上皮细胞的粘附率以及由于嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞引起的细胞膜损伤。这是载铜蒙脱石改善肠组织形态的重要原因。另一方面,载铜蒙脱石改善肠形态与蒙脱石的独特性质有关。蒙脱石作为药用矿物始载于《本草纲目拾遗》^[21],1982年被WHO列入腹泻病控制规划用药。蒙脱石作为黏膜保护剂已广泛应用于临床^[22]。蒙脱石通过与肠粘液糖蛋白识别、结合、定位,可在消化道形成胶体保护膜,从而降低细菌粘附素与肠粘膜受体的结合;蒙脱石还可提高粘液的质和量,能与粘液蛋白结合从而增强粘液的凝集性和内聚力,达到粘液屏障的作用,抵抗外来致病因子的侵入^[23,24]。

参考文献:

- [1] Ma Y L, Xu Z R. Advances in Ion-type Inorganic Antibacterial Materials [J]. *Materials Review*, 2004, **18**: 16—18, 48 [马玉龙, 许梓荣. 离子型无机抗菌材料研究进展. 材料导报, 2004, **18**: 16—18, 48]
- [2] Hu C H, Xia M S. Antibacterial effect of Copper-bearing montmorillonite on aquacultural pathogenic bacteria and discussion on its mechanism [J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society*, 2005, **3**: 1375—1379 [胡彩虹, 夏枚生. 载铜蒙脱石对水产病原菌的抗菌活性及其机理. 硅酸盐学报, 2005, **3**: 1375—1379]
- [3] Hu C H, Xu Z R, Xia M S. Antibacterial effect of Cu²⁺-exchanged montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* and discussion on its mechanism [J]. *Vet Microbiol*, 2005, **109**: 83—88
- [4] Hu C H, Xia M S, Xiong L, et al. Effects of Cu bearing montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* adhesion to epithelial cells of Nile tilapia [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29**: 619—623 [胡彩虹, 夏枚生, 熊莉, 等. 载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌粘附尼罗罗非鱼上皮细胞的影响. 水产学报, 2005, **29**: 619—623]
- [5] National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Fish [M]. Washington, DC: National Academy Press, 1993
- [6] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Systematically Determinative Bacteriology [M]. Beijing: Science Publishing Company, 2001 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001]
- [7] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Williams & Wilkins, Baltimore, 1993
- [8] Ye J D, Lu T Y, Liu H B, et al. Effect of okquinox on digestive enzyme activities and phagocytosis of leucocytes in *Cyprinus carpio* L. [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, **19**: 161—166 [叶继丹, 卢彤岩, 刘红柏, 等. 喹乙醇对鲤的消化酶活性及白细胞吞噬功能的影响. 大连水产学院学报, 2004, **19**: 161—166]
- [9] Wicken A J. Bacterial Adhesion: Mechanism and physiological significance. 2. Bacterial cell walls and surfaces [M]. New York: Plenum Press, 1985: 45—47
- [10] Guo T. Study on the mechanisms of adsorptive and antibacterial activity against intestinal pathogen of Cu-exchanged silicate nanoparticles in weanling pigs. P. D [D]. Zhejiang University, 2004: 105—107 [郭彤. 载铜硅酸盐纳米微粒对断奶仔猪肠道病原菌吸附、杀菌机理的研究. 博士学位论文. 浙江大学, 2004: 105—107]
- [11] Liu H B, Zhang Y, Yang Y H, et al. Effects of five Chinese herb medicines as additive in feed on the growth and intestinal microflora in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, **19**(1): 16—20 [刘红柏, 张颖, 杨雨辉, 等. 5种中草药作为添加剂对鲤肠内细菌及生长的影响. 2004, **19**(1): 16—20]
- [12] Girardeau J P. Smectite aggregation by *Escherichia coli* [J]. *Acta Gastroenterologica Belgica*, 1987, **50**: 181—192
- [13] Hu X R, Li G L, Chen L S, et al. Study on the mechanism of the interaction between montmorillonite and bacterium [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, **37**: 718—720 [胡秀荣, 吕光烈, 陈林深, 等. 天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究. 药学学报, 2002, **37**: 718—720]
- [14] Wang J X, Fang H S. Intestinal microecological observation of smectite in the treatment of dietary in children [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 1995, **11**: 134—137 [王俊侠, 方鹤松. 思密达治疗腹泻患儿肠道微生态学观察. 中国临床药理学杂志, 1995, **11**: 134—137]
- [15] Tang F S, Zhu X Y, Zhang X Z. The influences of common carp intestinal bacteria and its analyses on the host digestion [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, **18**: 177—182 [汤伏生, 朱晓燕, 张兴忠. 鲤鱼肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响. 水产学报, 1994, **18**: 177—182]
- [16] Tauqir N A, Nawaz H. Performance and economics of broiler chicks fed on rations supplemented with different levels of sodium bentonite [J]. *Int J Agri Biol*, 2001, **3**: 149—150
- [17] Venglovsky J, Pacajova Z, Sasakova N, et al. Adsorption properties of natural zeolite and bentonite in pig slurry from themicrobiological point of view [J]. *Veterinari Medicina*, 1999, **44**: 339—344
- [18] Hu C H, Xu Y, Xia M S, et al. Effects of Cu²⁺-exchanged montmorillonite on growth performance, microbial ecology and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2007, **270**(1—4): 200—206
- [19] Ding S L, Peng S P, Liu Q P, et al. Analysis of feasibility bentonite as feeding additive [J]. *Journal of Liaoning Technical*

- University (Natural Science Edition), 2003, **22**: 23—26 [丁述理, 彭苏萍, 刘钦甫, 等. 膨润土用作饲料添加剂可行性分析. 辽宁工程技术大学学报, 2003, **22**: 23—26]
- [20] Le S Y in Y Z, Ge R. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion [J]. *J Fish Diseases*, 1997, **20**: 169—175
- [21] Nanjing Medical University. Big thesaurus of Chinese traditional medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Publishing Company, 1991 [江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 科学技术出版社, 1991]
- [22] Zhao X H. The new use of smectite [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2003, **12**: 2263 [赵秀红. 思密达临床新用途. 现代中西医结合杂志, 2003, **12**: 2263]
- [23] Abengres E S, Urien J P, Tillement P, et al. Interactions between smectite, a mucus stabilizer and acidic and basic drugs [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1985, **28**: 601—605
- [24] Droy-Lefain M T, Drouet Y and Schatz B. Sodium glycodeoxycholate and spinability of gastrointestinal mucus. Protective effect of smectite [J]. *Gastroenterol*, 1985, **88**(Suppl 2): 1369

EFFECTS OF COPPER-BEARING MONTMORILLONITE ON INTESTINAL MICROFLORA AND DIGESTIVE FUNCTION OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

HU CaiHong¹, XU Yong¹, XIONG Li¹, XIA MeiSheng² and XU ZiRong¹

(1 College of Animal Science, Zhejiang University, the Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition of Ministry of Education, Hangzhou 310029

2 Department of Earth Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A total of 360 Nile tilapia at an average initial body weight of 3.9g were randomly allocated to 4 treatments each of which had three replicates of 30 fish/tank and used to investigate the effects of copper-bearing montmorillonite (Cu-MMT) on intestinal microflora and digestive function. The fish received the same basal diet and Cu-MMT was added to the basal diet at 0, 0.10%, 0.15% and 0.20%, respectively. As compared with the control, supplementation with Cu-MMT significantly reduced the total intestinal aerobic bacterial counts, affected the composition of intestinal microflora with a tendency of *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacteriaceae* and *Vibrio* decreasing. Addition of 0.10%, 0.15% and 0.20% Cu-MMT significantly improved the apparent digestibility coefficients of dry matter, crude protein and crude lipid and by 6.43%, 8.47% and 8.83%, 5.63%, 6.24% and 6.91%, 4.62%, 5.65% and 5.98%, respectively ($p < 0.05$). The apparent digestibility coefficient of ash were significantly improved by 18.77% and 15.09% with 0.15% and 0.20% Cu-MMT consumption ($p < 0.05$). Cu-MMT significantly improved the activities of the intestinal protease enzymes ($p < 0.05$), and promoted intestinal amylase and lipase activities with 0.15% and 0.20% Cu-MMT addition ($p < 0.05$). Cu-MMT also increased villus and microvillus heights at different sites of the intestine. The results suggest that Cu-MMT can inhibit effectively the growth and proliferation of pathogenic bacteria in the intestinal tract, which can protect intestinal mucosa from invasion of pathogenic bacterium and toxins, resulting in a positive effect on the health and function of intestinal mucosa, and then promote the digestion and absorption of dietary nutrition.

Key words Copper-bearing montmorillonite; Intestinal microflora; Digestive function; Nile tilapia