

doi: 10.7541/2023.2022.0496

发酵饲料对日本沼虾生长性能、抗氧化能力及肠道微生物的影响

李正中¹ 刘波^{1,2,3} 刘志桦³ 孙存鑫² 周群兰² 郑肖川² 孙梅⁴ 高亮⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081; 3. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214128;

4. 江苏省苏微微生物研究有限公司, 无锡 214063)

摘要: 为探究发酵饲料在日本沼虾中的养殖效果, 设计5个试验组, 分别投喂L1(100%基础饲料组)、L2(87.5%基础饲料+12.5%发酵饲料)、L3(75%基础饲料+25%发酵饲料)、L4(50%基础饲料+50%发酵饲料)和L5(100%发酵饲料)。试验选取大小相近的日本沼虾(0.09±0.01) g进行为期56d的养殖试验, 评估日本沼虾生长性能, 抗氧化指标和肠道微生物组成。结果显示, 饲料经过发酵后可溶蛋白和小肽含量得到显著提高($P<0.05$), 饲料有益菌含量增加, 霉菌得到抑制。养殖试验表明各组存活率均在80%以上, 增重率呈先上升后下降趋势, L3和L4组增重率显著高于对照组($P<0.05$), 饵料系数显著低于对照组($P<0.05$)。L3、L4和L5组超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于L1组($P<0.05$), L2、L3和L4组丙二醛(MDA)含量显著低于L1组($P<0.05$), L2和L5超氧阴离子清除率显著高于L1组($P<0.05$)。各试验组血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)含量均显著低于对照组($P<0.05$)。肠道微生物测序结果显示, L3组 α -多样性指数高于L1组, 在属水平上, L1组的气单胞菌属丰度显著高于L3组($P<0.05$), 而L1组分歧杆菌属和芽孢杆菌属丰度显著低于L3组($P<0.05$)。结果表明, 发酵饲料能够增加饲料中营养物质含量, 提高日本沼虾增重率, 降低饵料系数, 增强抗氧化能力, 可以改善日本沼虾肠道微生物群落结构, 对致病菌属有抑制作用, 适宜的发酵饲料添加比例为25%。

关键词: 发酵饲料; 生长性能; 抗氧化能力; 肠道微生物; 日本沼虾

中图分类号: S965

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)09-1435-11



自2020年起, 农业农村部规定饲料中全面禁止添加抗生素, 以此来减少滥用抗生素带来的危害^[1]。为此学者们研究出了很多替代方案, 包括: 抗菌肽^[2]、中草药提取物^[3]、益生菌^[4]和后生元^[5]等, 其中, 益生菌因其安全性、低成本和应用方便等优点而受到广泛青睐。水产养殖中的益生菌是一类对养殖生物和养殖水体有益的微生物的总称, 包括: 光合细菌(Photosynthetic bacteria)^[6]、乳酸菌(*Lactobacillus*)^[7]、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[8]和芽孢杆菌(*Bacillus*)^[9]等, 目前在养殖业中, 常用的菌种共有35种^[10]。

微生物固态发酵饲料是指在人工控制下利用

微生物对饲料底物进行发酵的过程, 具有改变饲料的营养特性、适口性和安全性的优点^[11]。微生物在发酵过程中可对饲料进行“预消化”, 通过自身代谢活动可以减少饲料中单宁^[12]、植酸^[13]、游离棉酚^[14]和硫甙^[15]等抗营养因子的含量, 增加可溶性蛋白^[16]、酸溶性蛋白^[17]和小肽^[18]等营养物质的含量。另外, 研究表明微生物在发酵过程中可以分解膳食纤维, 产生多种单糖, 有利于肠道微生物的生长^[19, 20], 并且微生物能在宿主体内定植, 抑制有害菌对消化肠黏膜的损害^[21]。此外, 微生物还可代谢产生短链脂肪酸提高养殖动物免疫力^[22, 23]。因此, 微生物发酵饲料的应用能为水产养殖业高质量发

收稿日期: 2022-12-12; 修订日期: 2023-01-11

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2022XT0401和2020TD59); 国家现代农业产业技术体系(CARS-48); 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS [2022] 514); 无锡市现代农业前瞻性及其关键技术类项目(N20203007)资助 [Supported by Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2022XT0401 and 2020TD59); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); Jiangsu Modern Agricultural Industry Technology System (JATS [2022] 514); Wuxi Modern Agriculture Forward-looking and Common Key Technology Projects (N20203007)]

作者简介: 李正中(1999—), 男, 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: lzz18796583683@163.com

通信作者: 刘波, E-mail: liub@ffrc.cn

展提供坚实的保障。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)俗称青虾, 隶属长臂虾科(*Palaemonidae*), 是我国淡水养殖业中主要的经济虾类之一, 养殖产量与效益比较稳定。据统计, 2021年日本沼虾的产量约为23万吨^[24]。目前养殖户主要使用的是南美白对虾(*Penaeus vannamei*)或罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等其他相关品种的饲料, 导致适口性不强, 吸收利用效率低下, 导致残饵堆积和疾病等问题^[25]。而发酵饲料则可以在喂食前对饲料进行“预消化”, 投喂后养殖动物可以更易吸收营养物质, 减少水体污染。因此本试验用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、酿酒酵母和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)混合菌种发酵基础日本沼虾饲料, 通过对比饲料发酵前后营养物质的变化, 探索发酵饲料和基础饲料的不同配比对日本沼虾生长性能、抗氧化能力及肠道微生物的影响, 以期选出发酵饲料和基础饲料适宜的配比。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

日本沼虾基础饲料由江苏冠乾特种水产饲料有限公司生产(配方见表1), 复合菌组包括: 枯草芽孢杆菌CGMCC No.18684、酿酒酵母CICC1421和植物乳杆菌CCTCC No: M20211221, 浓度见表2。发酵饲料由复合菌种发酵基础饲料制得, 复合菌种由本实验室保存提供, 将复合菌剂与日本沼虾饲料混合均匀, 添加量为饲料重量的0.5%(w/w), 加灭菌水调节物料含水量为30%(w/w), 在发酵袋(有单向出气阀门)密闭发酵, 环境温度恒定35℃, 饲料发酵5d。

将基础饲料与发酵饲料按照不同比例混合均匀, 设计5个试验组: L1组(100%基础饲料)、L2组(87.5%基础饲料+12.5%发酵饲料)、L3组(75%基础饲料+25%发酵饲料)、L4组(50%基础饲料+50%发酵饲料)和L5组(100%发酵饲料)。

1.2 养殖管理

养殖试验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心大浦基地开展。试验选取规格相近的日本沼虾(0.09 ± 0.01) g共900尾, 随机分成5组, 每组3个生物学重复, 每个重复60尾, 养殖于15个直径140 cm, 深100 cm的圆柱体养殖缸中, 其中养殖水深50 cm。每日根据饲料分组情况投喂相应的饲料, 日投喂量为日本沼虾体重的5%—8%(根据日本沼虾的摄食情况和生长情况调整投喂量, 以投喂1h后吃完为宜), 每日投喂3次(8:00、12:00和18:00), 均为饱食投喂, 投喂完1h后将未吃完的饲料捞出烘干称

重。定期检测水质指标, 保证试验期间溶氧 ≥ 6.0 mg/L, pH 7.3 ± 0.6 , 氨氮 < 0.2 mg/L, 亚硝酸盐 < 0.005 mg/L。每天使用排污管排污, 每周1次换水。每天观察日本沼虾的生长和摄食情况, 发现死虾后及时捞起, 称重并做好记录, 养殖试验共进行56d。

1.3 饲料活菌数量检测

活菌检测项目: 细菌总数、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和霉菌。总菌-采用倾注法, 在LB营养琼脂平板上, 35℃培养48h后计数; 芽孢杆菌-采用倾注法, 将菌悬液经80℃水浴10min后在LB营养琼

表1 基础饲料配方

Tab. 1 Basic feed formula

成分 Composition	比例 Ratio (%)	营养物质含量 Content of nutrients	比例 Ratio (%)
国产鱼粉Domestic fishmeal	4.0	干物质Dry matter	89.62
虾粉Shrimp powder	2.0	粗蛋白Crude protein	38.12
虾壳粉Shrimp shell powder	3.0	粗脂肪Crude fat	5.12
鸡肉粉Poultry by-product meal	2.0	赖氨酸Lysine	1.60
鸡血球蛋白粉Chicken hemoglobin powder	6.0	蛋氨酸Methionine	0.46
谷氨酸渣Glutamic acid residue	2.0	色氨酸Tryptophan	0.296
鱿鱼膏Squid paste	2.0		
豆粕46Soybean meal	10.0		
花生粕Peanut meal	8.0		
菜籽饼Rapeseed meal	14.0		
棉籽浓缩蛋白Cottonseed protein concentrate	5.0		
棉粕Cottonseed meal	7.0		
米糠Rice bran	10.5		
小麦粉(面粉)Flour	17.97		
大豆油Soybean oil	0.5		
大豆磷脂油Soybean lecithin oil	1.0		
沸石粉Zeolite powder	2.0		
磷酸二氢钙Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2.0		
大黄提取物Rhubarb extract	0.03		
预混料Premix	1.0		

表2 复合菌剂组成和初始浓度

Tab. 2 Composition and concentration of compound bacterial agent

菌种Strain	菌浓Concentration (CFU/kg)
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	$\geq 5.0E+12$
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\geq 1.5E+12$
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	$\geq 1.0E+12$

脂平板上, 35℃培养48h后计数; 乳酸菌-采用倾注法, 在MRS固体培养基中, 35℃厌氧培养48h后计数, 在平板上能产生透明圈的视为产酸乳杆菌, 反之则为不产酸乳杆菌; 酵母菌-采用倾注法, 在虎红(孟加拉红)培养基中, 28—30℃培养48h后计数; 霉菌参照国标GB/T13092-2006, 采用倾注法, 在高盐察氏培养基中, 29℃培养96h后计数。

1.4 可溶蛋白和小肽含量检测

采用考马斯亮蓝法测定饲料可溶蛋白含量: 在一定蛋白浓度内, 蛋白质和染料结合符合比尔定律, 此染料和蛋白质结合后颜色由红转蓝, 最大吸光由465转为595 nm, 通过测定595 nm处的吸收量测定蛋白含量^[26]。采用三氯乙酸法测定饲料中的小肽含量: 利用三氯乙酸作蛋白质沉淀剂, 将样品中的蛋白质和肽链较长的肽沉淀, 将其中的小肽用酸溶解出来, 从而测得小肽含量^[27]。

1.5 样品采集

在养殖结束后, 每个养殖桶随机挑取30尾虾, 用1 mL 无菌注射器, 在围心腔采血后, 4000 r/min 离心 10min 后放入2 mL离心管中, 血样采用混合样本, 每桶3个混合样本; 在采集血淋巴后, 虾用无菌PBS溶液冲洗、无菌滤纸吸干后, 在冰上进行解剖, 分离肝胰腺与肠道, 放入-80℃保存, 一部分用于肠道菌群分析, 剩余虾肠道用于酶活指标的测定, 肠道和肝胰腺采取混合样本, 每桶3个样; 每个养殖桶随机挑取30尾虾, 剥出肌肉, 放入2 mL 冻存管中, 在-80℃条件下进行保存。

1.6 生长指标测定

在养殖试验结束后, 记录日本沼虾的起始重量(IBW)和末重量(FBW), 并计算出存活率(SR)、增重率(WGR)和饵料系数(FCR)。

$$\text{增重率(WGR, \%)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$$

$$\text{饵料系数(FCR)} = \text{FI} / W_t$$

$$\text{存活率(SR, \%)} = \text{末尾数} / \text{初始尾数} \times 100$$

式中, W_0 为日本沼虾初始重量, W_t 为日本沼虾终末重量, t 为养殖天数, FI 表示日本沼虾摄食饲料总量, W_t 为日本沼虾总增重。

1.7 血清生化指标测定

对离心后的血淋巴样品, 吸取300 μL 到样品杯中, 用Mindray公司生产的MAGLUMI 1000全自动血清生化分析仪, 参照试剂盒说明书对血清总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)、葡萄糖(GLU)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、总胆固醇(TC)和白蛋白(ALB)含量进行测定。

1.8 抗氧化指标测定

丙二醛(MDA)含量参照南京建成MDA试剂盒

测定方法: 过氧化脂质降解产物中的MDA可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合, 形成红色产物。根据吸光度差值进一步计算出丙二醛的含量, 血清中MDA含量单位为nmol/mL。超氧化物歧化酶(SOD)含量参照南京建成SOD试剂盒及检测, 血清中SOD活力单位定义: 每毫升反应液中SOD抑制率达到50%时所对应的SOD量为一个SOD酶活单位(U)。超氧阴离子去除率参照苏州科铭试剂盒, 测定原理: AP-TEMED系统产生超氧阴离子, 与盐酸羟胺反应生成 NO_2 , NO_2 与对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用生成红色的偶氮化合物, 在530 nm处有特征吸收峰, 样品对超氧阴离子的清除能力与530 nm的吸光值呈负相关。

1.9 肠道菌群检测

选取L1和L3组采集肠道样品, 每组3个重复, 送至南京集思慧远生物科技有限公司, 使用E.Z.N.A.[®] Soil(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)试剂盒提取肠道内容物中的微生物组总DNA后, 设计16S V3—V4区特定引物扩增特异区域, 得到420 bp左右扩增片段。加接头, 采用Illumina Novaseq 6000 平台, 测序得到2×250 bp的paired-end数据, 通过拼接, 可以得到较长序列, 从而进行16S分析, 包括数据优化及序列统计, 对原始数据进行过滤处理并得到优化序列, 对获得的序列按97%的序列相似度进行归并和操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU)划分, 通过QIIME软件计算Alpha多样性分析, 其中包括Chao1、Observed species和Shannon指数。并在门水平和属水平上对不同菌群分布的均匀度及多样性进行统计分析。

1.10 数据处理

用SPSS 20.0软件进行数据的统计分析。用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 t 检验进行分析统计学差异性, 差异显著用 $P < 0.05$ 表示。

2 结果

2.1 发酵饲料微生物指标分析

由表3可知, 经过发酵后, 饲料总菌含量由 $1.1\text{E}+03$ 增加到 $1.85\text{E}+07$ CFU/g; 芽孢杆菌、酵母菌数量经过发酵后均有明显的增长; 霉菌数量由未发酵前的35减少到 <10 CFU/g, 得到抑制; 产酸乳杆菌和不产酸乳杆菌数量均由 10^3 增加到 10^6 CFU/g, 增幅明显。

表4显示, 饲料发酵后pH由6降低到5.81, 风味得到改善; 颜色由黄色变为棕色。

2.2 发酵后饲料可溶蛋白和小肽含量的变化

由图1可知, 与基础饲料相比, 发酵后饲料的可

表3 发酵前后饲料微生物含量的变化

Tab. 3 Changes of feed microbial content after fermentation

测定菌种 Strain	发酵前 Before fermentation (CFU/g)	发酵后 After fermentation (CFU/g)
总菌Colonies	1.10E+03	1.85E+07
芽孢杆菌Bacillus	<10	1.13E+07
酵母菌Yeast	<10	4.40E+06
霉菌Mold	3.50E+01	<10
产酸乳杆菌 Producing acid Lactobacillus	5.25E+03	6.85E+06
不产酸乳杆菌 Non-producing acid	1.75E+03	3.55E+06

表4 发酵后饲料表观特征的变化

Tab. 4 Changes of feed apparent characteristics after fermentation

指标 Index	发酵前 Before fermentation	发酵后 After fermentation
pH	6	5.81
风味 Flavor 颜色 Color	黄色	酸味+酒糟味 棕色

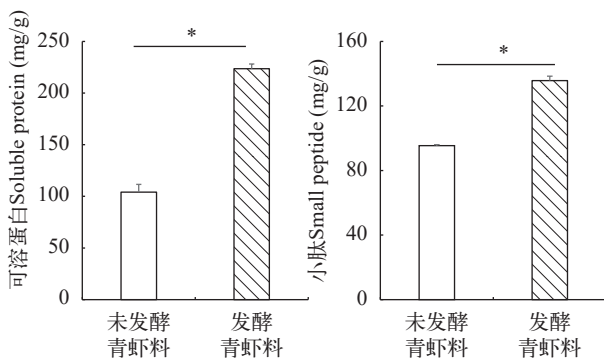


图1 发酵后饲料可溶蛋白和小肽含量的变化

Fig. 1 Changes of soluble protein and small peptide contents in feed after fermentation

“*”代表有显著差异($P<0.05$)“*” represents significant difference($P<0.05$)

溶蛋白含量由104显著增加到223 mg/g($P<0.05$); 与基础饲料相比, 小肽的含量由95显著上升到135 mg/g($P<0.05$)。

2.3 发酵饲料对日本沼虾生长性能的影响

由表5可知, 各个试验组的存活率均在80%以上, 没有显著差异($P>0.05$); L3和L4组的末均重和增重率显著高于L1组($P<0.05$); 各试验组的饵料系数均显著低于L1组($P<0.05$)。

2.4 发酵饲料对日本沼虾血清生化指标的影响

由表6所示, L1和L2的AST含量显著高于L3、L4和L5的AST含量($P<0.05$); 各试验组与L1相比, ALT含量显著降低($P<0.05$), ALB含量显著增加($P<0.05$); L2、L3和L4的GLU含量均显著高于

L1($P<0.05$); TG、TC及TP含量各组之间没有显著差异($P>0.05$)。

2.5 发酵饲料对日本沼虾抗氧化指标的影响

由图2可知, 与L1相比, L3、L4和L5的SOD活性显著增加($P<0.05$); L5的超氧阴离子清除率显著高于L1, 但是L4的超氧阴离子清除率显著低于L1($P<0.05$); L5 MDA含量显著高于其余组($P<0.05$), L3和L4 MDA含量显著低于L1($P<0.05$)。

2.6 发酵饲料对日本沼虾肠道物种数目的影响

选取L1和L3组送测16S rRNA肠道微生物, 将测得微生物进行分类汇总, 对应到门、纲、目、科和属5个水平(表7), L3组的目和科的分类水平所含的物种数目显著高于L1组($P<0.05$), 门、纲和属水平的物种数目L3组高于L1组, 两组间没有显著差异($P>0.05$)。用Observed species、Shannon和Chao1指数来比较两组间肠道菌群的Alpha多样性指标(表8), L3组的Observed species、Shannon和Chao1指数均显著高于L1组($P<0.05$)。

根据OTUs聚类分析构建韦恩(图3), L1组和L3组共有的OTU个数为222个, L3组独有的个数多于L1组。PCA分析图表明(图4), 两组的群落差异大, 其差异主要来自PC2。

2.7 发酵饲料对日本沼虾肠道群落结构的影响

L1和L3肠道菌群门水平群落结构如图5A所示: L1的优势菌门(平均丰度>1%)为变形菌门(Pro-

表5 发酵饲料对日本沼虾生长性能的影响

Tab. 5 Effects of fermented feed on survival rate, final average weight, weight gain rate and feed conversion ratio of *Macrobrachium nipponense*

组别 Group	存活率 SR (%)	末均重 Final average weight (g)	增重率 WGR (%)	饵料系数 FCR
L1	91.11±2.0	0.575±0.007 ^c	538.412±7.997 ^c	2.85±0.038 ^a
L2	88.33±2.887	0.584±0.002 ^{bc}	548.697±1.539 ^{bc}	2.30±0.024 ^b
L3	87.78±2.004	0.644±0.011 ^a	615.326±12.37 ^a	2.60±0.066 ^b
L4	81.67±2.887	0.613±0.02 ^{ab}	581.226±22.214 ^{ab}	2.21±0.133 ^b
L5	87.22±3.888	0.589±0.008 ^{bc}	553.272±7.816 ^{bc}	2.19±0.09 ^b

注: L1. 100%基础饲料; L2. 87.5%基础饲料+12.5%发酵饲料; L3. 75%基础饲料+25%发酵饲料; L4. 50%基础饲料+50%发酵饲料; L5. 100%发酵饲料(下同); 表中同列肩标相同的小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Note: L1. 100% basic feed; L2. 87.5% basic feed +12.5% fermented feed; L3. 75% basic feed +25% fermented feed; L4. 50% basic feed +50% fermented feed; L5. 100% fermented feed (same as below). The same lowercase letters or no letters in the same column mean no significant difference ($P>0.05$), and different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$). The same applies below

表 6 发酵饲料对日本沼虾血清生化指标的影响

Tab. 6 Effects of fermented feed on serum biochemical Indices of *Macrobrachium nipponense*

组别 Group	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALB (g/L)	GLU (nmol/L)	TG (nmol/L)	TC (nmol/L)	TP (g/L)
L1	11.6±0.643 ^a	13.7±0.52 ^a	4.68±0.32 ^b	55.99±1.7 ^b	0.17±0.02	0.24±0.02	28.41±2.35
L2	9.83±0.617 ^a	8.0±2.04 ^{bc}	5.6±0.28 ^a	71.3±0.46 ^a	0.19±0.02	0.3±0.03	28.87±1.13
L3	7.87±0.145 ^b	8.37±0.219 ^{bc}	5.7±0.14 ^a	70.66±2.6 ^a	0.18±0.04	0.27±0.02	25.6±1.34
L4	7.23±0.933 ^b	5.87±1.146 ^c	5.43±0.2 ^a	75.35±4.86 ^a	0.22±0.01	0.32±0.04	22.15±1.8
L5	6.15±0.486 ^b	10.3±0.233 ^b	5.57±0.03 ^a	65.37±4.59 ^{ab}	0.2±0.06	0.23±0.03	29.14±3.32

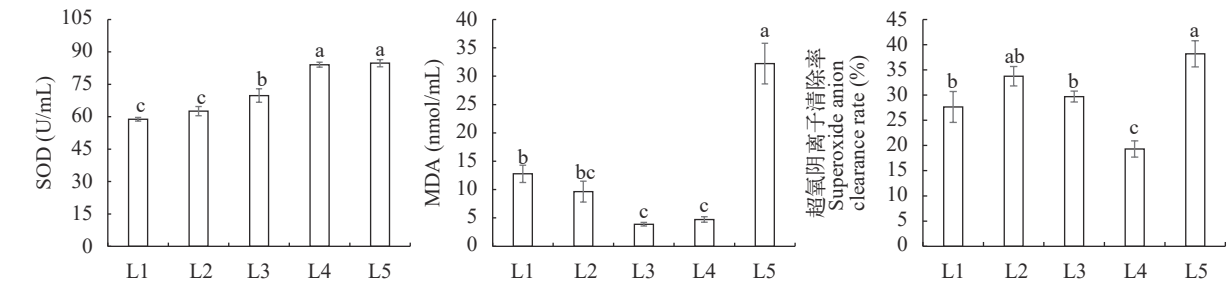


图 2 发酵饲料对日本沼虾抗氧化能力的影响

Fig. 2 Effects of fermented feed on antioxidant capacity of *Macrobrachium nipponense*

图中相同小写字母或者无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

The same lowercase letters or no letters in the figure indicate no significant difference ($P>0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

表 7 样本OTU种类及不同分类水平统计

Tab. 7 Statistics of OTU species and different classification levels

项目 Item	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
L1	16.0±1.15	26.33±0.88	54±2.65	78.67±4.06	119±4.36
L3	18.67±0.88	34.33±1.20	67.67±2.40	93.67±3.18	130±8.50
P-value	0.14	0.06	0.019	0.044	0.314

表 8 Alpha多样性指数统计表

Tab. 8 Alpha diversity index statistics table

项目 Item	Observed species指数	Shannon指数	Chao1指数
L1	189.67±9.61	2.2±0.18	203.6±6.16
L3	234±7.77	2.97±0.04	248.01±10.43
P-value	0.023	0.014	0.021

teobacteria)、柔膜菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes); L3的优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、柔膜菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。

L1和L3肠道菌群属水平群落结构如图 5B 所示: L1的优势菌属为Candidatus Hepatinticola属、气单胞菌属(Aeromonas)、梭状芽孢杆菌属(Clostridium sensu stricto 12)和柠檬酸杆菌属(Citrobacter); L3的优势菌属为Candidatus hepatinticola属和Psychromonas属。



图 3 添加不同发酵饲料组的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of different fermented feed groups

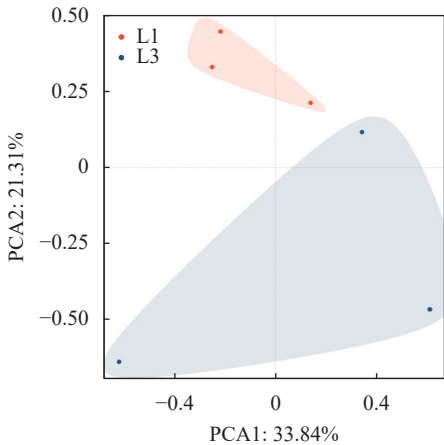


图 4 添加不同发酵饲料组肠道PCA分析

Fig. 4 PCA analysis of intestinal tract in different fermented feed groups

2.8 发酵饲料对日本沼虾肠道菌群差异性的影响

用 t 检验对两组进行门水平差异菌群分析, $P < 0.05$ 视为有显著性差异。由图 6 可知, L3 的蓝藻菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和放线菌门(Actinobacteria)的丰度显著高于 L1 ($P < 0.05$)。在属水平上, L1 气单胞菌属丰度显著高于 L3 ($P < 0.05$), L3 芽孢杆菌属和分歧杆菌属丰度显著高于 L1 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 微生物发酵对饲料营养成分的影响

发酵饲料是利用一种或多种复合微生物对饲料进行发酵的过程, 在发酵过程中将大分子物质分解为有机酸、可溶性多肽等小分子物质, 便于动物消化吸收^[28]。枯草芽孢杆菌和酵母菌在发酵过程中能够产生多种消化酶, 并且酵母菌和芽孢杆菌在

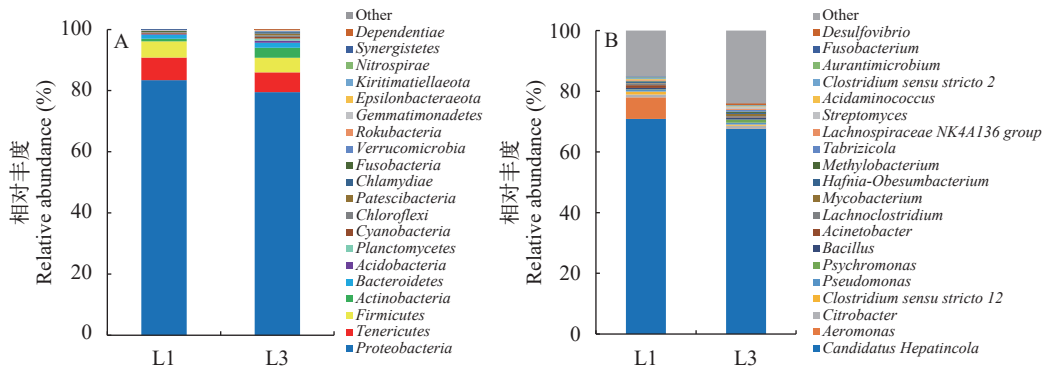


图 5 日本沼虾肠道群落组成分析(A. 门水平; B. 属水平)

Fig. 5 The analysis of intestinal community composition of *Macrobrachium nipponense* (A. phylum level; B. genus level)

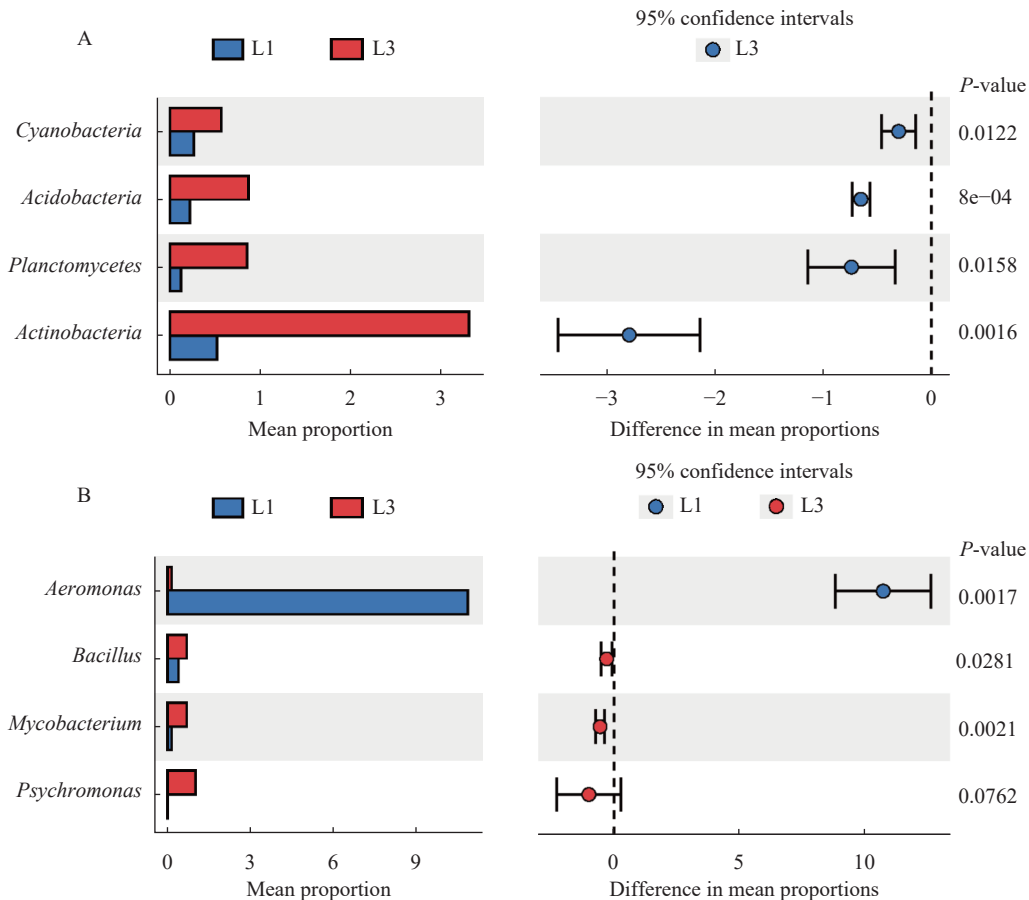


图 6 差异菌群分析(A. 门水平; B. 属水平)

Fig. 6 The analysis of the level of different flora phyla (A. phylum level; B. genus level)

图中 $P > 0.05$ 没有显著差异, $P < 0.05$ 有显著差异

$P > 0.05$ show no significant difference, while $P < 0.05$ show significant difference

发酵过程中能够吸收发酵袋中的氧气, 抑制好氧有害菌的增殖, 有利于植物乳杆菌等厌氧菌的生长^[29, 30]。本试验基础饲料在经过微生物发酵后, 增加了可溶蛋白和小肽的含量, 能够让日本沼虾在摄食饲料后更容易吸收到蛋白质, 促进机体生长。益生菌在发酵过程中自身不断增殖, 产生代谢产物, 如植物乳杆菌在发酵过程中能够产生乳酸等^[30], 动物摄食后益生菌可在肠道中定植, 形成优势菌, 抑制肠道有害菌, 维持机体健康。

3.2 发酵饲料对日本沼虾生长性能及血清生化的影响

黄世金等^[31]研究发现, 添加15%的发酵饲料能促进罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)生长, 提高其存活率, 降低饵料系数。Yu等^[32]研究结果表明, 发酵蛋白饲料显著提高螃蟹(*Eriocheir sinensis*)均重, 雄性螃蟹的平均重量和数量比对照组有所改善。许晨远等^[33]结果显示, 在额外投喂发酵饲料后, 各组幼蟹的增重率和特定生长率均较对照组显著升高, 饵料系数显著降低。本试验也表明投喂发酵饲料增重趋势呈先上升后下降, L3和L4的增重率显著高于L1, L3的增重率最高, 试验组的饵料系数均显著低于对照组。这说明添加25%发酵饲料能显著增加日本沼虾的增重率, 提高饲料利用率。

AST和ALT主要存在于肝脏细胞中的氨基转氨酶, 对鱼虾代谢活动具有重要意义^[34, 35]。在正常情况下血清中的含量较低, 只有当肝脏出现损伤时, AST和ALT才会大量进入血液, 导致含量变高^[36, 37], 本试验结果显示, L3、L4和L5的AST和ALT含量均显著低于L1组, 表明添加发酵饲料有助于降低日本沼虾肝脏的损伤, 结果与杨景峰等^[38]和Gyan等^[39]一致。总蛋白(TP)由白蛋白(ALB)和球蛋白(GLB)组成, ALB在水生动物免疫反应中起着重要作用^[40], 其含量与机体生长有着密切的联系^[41, 42]。通常当免疫功能增强时, 机体的ALB水平会升高^[43]。在本试验中, 各试验组的TP含量没有显著差异, 试验组的ALB水平均显著高于对照组, 说明摄食发酵饲料有助于增强日本沼虾的免疫力。总胆固醇(TC)和总甘油三酯(TG)含量多少反映了动物的脂类代谢的能力, 本试验日本沼虾血清中的总胆固醇(TC), 总甘油三酯(TG)含量各组间没有显著差异, 说明摄食发酵饲料对虾脂代谢不会产生影响。试验组葡萄糖(GLU)含量均显著高于对照组, 表明发酵饲料可能提高了虾机体糖代谢的能力。

3.3 发酵饲料对日本沼虾抗氧化能力的影响

超氧化物歧化酶(SOD)通过催化两个超氧自由基歧化为 H_2O_2 和氧气来清除细胞质中的ROS^[44], 因

此常被用于辅助评价机体非特异性免疫机能^[45]。丙二醛(MDA)是自由基脂质过氧化损伤的最终产物之一, 具有细胞毒性, 能够反映过氧化对机体的损伤程度^[46]。杨树浩^[47]研究发现添加30%微生物发酵制剂能极显著提高罗氏沼虾SOD活性; 赵云龙等^[48]的研究表明用12 mL蜜环菌菌液发酵1 kg基础饲料可以显著提高花鳅(*Cobitis sinensis*)的抗氧化能力。本研究中L3、L4和L5的SOD活性均显著高于L1; L3和L4的MDA含量显著低于L1; L2和L4的超氧阴离子去除率显著高于L1, 表明添加25%发酵饲料日本沼虾的抗氧化能力较好。值得一提的是, L5组MDA含量显著高于其余组, 说明全部摄食发酵饲料可能影响日本沼虾的抗氧化能力, 需要进一步研究。

3.4 发酵饲料对日本沼虾肠道微生物的影响

生物发酵饲料在水产养殖中已得到广泛应用, 微生物在饲料发酵过程中其代谢产物可改善动物肠道菌群结构, 促进动物的生长^[49, 50], 并且肠道微生物能与宿主相互作用, 参与多种代谢活动^[51]。Zhang等^[52]研究发现发酵饲料能影响南美白对虾的肠道菌群结构, 增加和改善肠道微生物群落的 α -多样性指数、群落结构组成和功能。姚海行等^[53]研究表明投喂发酵饲料增加了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肠道菌群多样性, 提高了肠道中有益菌的丰度。

本试验结果显示, L3组的群落多样性较L1组更丰富, 群落结构差异较大, 证明添加25%发酵饲料能够对肠道微生物群落结构产生影响。L3组酸杆菌门、浮霉菌门及放线菌门丰度显著高于L1组。有研究表明, 放线菌门能参与调节肠道通透性、免疫系统和代谢过程, 对肠道内稳态的发展和维持起着重要作用^[54]; 本实验也表明气单胞菌属在L1组的丰度要显著高于L3组, L3组的双歧杆菌属和芽孢杆菌属丰度显著高于L1组。气单胞菌属隶属弧菌科(*Vibrionaceae*), 是水产动物的重要病原体, 能够引起肠道和肠外的疾病^[55]。双歧杆菌属隶属于放线菌门, Huang等^[56]研究发现, 放线菌能够对维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)产生拮抗作用。芽孢杆菌属能够分泌消化酶同时抑制病原微生物^[57], 研究表明, 芽孢杆菌属对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和弧菌(*Vibrio*)等致病菌有较好的抑制作用^[58, 59]。这些结果表明, 摄食发酵饲料有助于提高有益菌群的丰度, 降低有害菌对机体的致病作用。

4 结论

25%发酵饲料和75%基础饲料的配比能够提高

日本沼虾的增重率,降低饵料系数,改善肠道微生物群落结构,增加肠道芽孢杆菌属,双歧杆菌属的有益菌数量,抑制气单胞菌属等致病菌丰度,增强机体免疫力和抗氧化能力。

参考文献:

- [1] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China No. 194 [J]. *Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China*, 2019(7): 126. [中华人民共和国农业农村部公告第194号 [J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2019(7): 126.]
- [2] Bhat R A H, Thakuria D, Tandel R S, *et al.* Tools and techniques for rational designing of antimicrobial peptides for aquaculture [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2022(127): 1033-1050.
- [3] Al-Niaeem K S, Resen A K, Al-Haider S M. Potential of herbal extracts to avoid the bacterial infection of *Enterobacter cloacae* in common carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *Earth and Environmental Science*, 2021, **779**(1): 012118.
- [4] Zhao Z T, Shi L, Wang W J, *et al.* Research progress on application of probiotics, prebiotics and synbiotics to prevent vibriosis in fish [J]. *Feed Research*, 2022, **45**(16): 115-119. [赵志涛, 石磊, 王文娟, 等. 益生菌、益生元和合生元预防鱼类弧菌病应用的研究进展 [J]. *饲料研究*, 2022, **45**(16): 115-119.]
- [5] Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Research of postbiotics and industrial application [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, **22**(8): 416-426. [中国食品科学技术学会益生菌分会. 后生元的研究现状及产业应用 [J]. *中国食品学报*, 2022, **22**(8): 416-426.]
- [6] Sagir E, Alipour S. Photofermentative hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria: Current perspectives and challenges [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021(141): 110796.
- [7] Wu Y Y, Sun R J, Mi H F, *et al.* The Current situation and application of biological fermentation feed in aquaculture [J]. *China Feed*, 2018(13): 60-63. [吴业阳, 孙瑞健, 米海峰, 等. 生物发酵饲料现状及在水产养殖上应用 [J]. *中国饲料*, 2018(13): 60-63.]
- [8] Yu M N, Chen Y K, Zhang Y R, *et al.* Application of microbial fermented feed in aquaculture [J]. *China Feed*, 2021(2): 70-73. [于梦楠, 陈玉珂, 张宇柔, 等. 微生物发酵饲料在水产养殖中的应用 [J]. *中国饲料*, 2021(2): 70-73.]
- [9] Hlordzi V, Kuebutornye F K A, Afriyie G, *et al.* The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: a review [J]. *Aquaculture Reports*, 2020(18): 100503.
- [10] Huang B, Zhao B, Chen P, *et al.* Production and application of microbial fermentation feed [J]. *Farm Products Processing*, 2018(21): 68-70. [黄波, 赵斌, 陈鹏, 等. 微生物发酵饲料的生产及其应用 [J]. *农产品加工*, 2018(21): 68-70.]
- [11] Miao G W. Optimization of solid-state fermentation parameters of corn gluten meal and the effect of antioxidant capacity of products on broilers [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016: 3-9. [苗国伟. 微生物固态发酵玉米蛋白粉工艺优化及其对肉鸡抗氧化能力的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016: 3-9.]
- [12] Wang Y, Yuan G H, Duan P P, *et al.* Effect of different enzymes, bacteria and compound enzyme bacteria preparations on tannin content in grape seed fermented feed [J]. *Feed Research*, 2022, **45**(5): 73-77. [王彦, 袁国宏, 段平平, 等. 不同酶、菌及复合酶菌制剂对葡萄籽发酵饲料中单宁含量的影响 [J]. *饲料研究*, 2022, **45**(5): 73-77.]
- [13] Lü J. Effects of different probiotic fermented corn-soybean meal feeds on production performance, lipid metabolism and intestinal health of laying hens [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022: 8-10. [吕静. 不同益生菌发酵玉米-豆粕饲料对蛋鸡生产性能、脂质代谢和肠道健康的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022: 8-10.]
- [14] Qi X Y, Xie Q X, Yu J M, *et al.* Screening of free gossypol strain in high efficient degrading cottonseed meal and the optimization of compound fermentation [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2019, **34**(1): 99-106. [亓秀晔, 谢全喜, 于佳民, 等. 高效降解棉籽粕中游离棉酚菌株的筛选及复配发酵方式的优化 [J]. *中国粮油学报*, 2019, **34**(1): 99-106.]
- [15] Ji L L. Study on mixed fermentation of rapeseed meal feed with probiotics [D]. Huai'an: Huaiyin Institute of Technology, 2020: 28-35. [嵇乐乐. 益生菌混合发酵菜籽粕饲料的研究 [D]. 淮安: 淮阴工学院, 2020: 28-35.]
- [16] Jiang C Y, Liu X L, Wang S. Optimization of fermentation technology for corn gluten meal feed by response surface [J]. *China Feed*, 2021(21): 123-126+142. [江成英, 刘晓兰, 王松. 响应面法优化玉米蛋白粉饲料发酵工艺 [J]. *中国饲料*, 2021(21): 123-126+142.]
- [17] Liu K Y. Breeding of highly resistant strains of bacillus coagulans using ARTP and adaptive laboratory evolution for soybean meal fermentation [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020: 42-50. [刘凯月. 基于ARTP和适应性进化选育高抗逆性凝结芽孢杆菌及其发酵豆粕的研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020: 42-50.]
- [18] Lin C H. The optimization of broiler feed fermentation processing and its nutrition evaluation [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018: 10-19. [吝常华. 肉鸡饲料原料发酵工艺优化及其营养价值评定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018: 10-19.]
- [19] Wang M, Jiang M, Li H, *et al.* Investigation on the regular patterns of mannan oligosaccharides degradation and utilization by lactic acid bacteria [J]. *Food and Fermenta-*

- tion Industries, 2016, 42(11): 20-24. [王苗, 蒋敏, 李恒, 等. 乳酸菌对魔芋甘露低聚糖的降解与利用 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 20-24.]
- [20] Yan Q, Yang H, Jiang Z, et al. A novel thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its application in oligosaccharide production from oat bran [J]. *Carbohydrate Research*, 2018(469): 31-37.
- [21] Wang B T, Yang W L, Li L P, et al. Research progress on mechanism of microbial fermentation feed replacing antibiotics [J]. *China Feed*, 2022(1): 10-13+18. [王佰涛, 杨文玲, 李灵平, 等. 微生物发酵饲料替抗机理研究进展 [J]. 中国饲料, 2022(1): 10-13+18.]
- [22] Li H F, Wang W B, Ma C. Screening and identification of a *Pediococcus acidilactici* and analysis of acid production from solid fermentation feed materials [J]. *China Feed*, 2019(17): 43-47. [李慧芬, 王文博, 马成. 一株乳酸片球菌的筛选、鉴定及其固态发酵饲料原料的产酸分析 [J]. 中国饲料, 2019(17): 43-47.]
- [23] Xu Z X, Li D F, Yu C W, et al. Effects of microbial fermented feed on rumen fermentation function of dairy cows and nutrient in vitro digestibilities of diets [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(3): 1513-1522. [徐子萱, 李冬芳, 于春微, 等. 微生物发酵饲料对奶牛瘤胃发酵功能及饲料营养物质体外消化率的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(3): 1513-1522.]
- [24] Yearbook [J]. *World Agriculture*, 2021(4): 2+13 [年鉴 [J]. 世界农业, 2021(4): 2+113.]
- [25] Liu B, Jiang S F, Huang Z B. Habit of freshwater shrimp and key feeding techniques [J]. *Scientific Fish Farming*, 2020(10): 84. [刘波, 蒋速飞, 黄志斌. 青虾的习性与饲料投喂关键技术 [J]. 科学养鱼, 2020(10): 84.]
- [26] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [27] Luo H Y. Effects of fermented feed on egg quality [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019: 11-13. [罗皓予. 发酵饲料对蛋品质的影响 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019: 11-13.]
- [28] El-Mansi M. Fermentation Microbiology and Biotechnology [M]. Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition. Fourth edition. Boca Raton: Taylor & Francis, CRC Press, 2018: 3-8.
- [29] Yao Z F, Feng Y Z, Wang L, et al. Application and research progress of yeast and lactic acid bacteria on bio-fermented feed [J]. *Feed Research*, 2020, 43(10): 154-158. [姚志芳, 冯宇哲, 王磊, 等. 酵母菌和乳酸菌在生物发酵饲料中的应用研究进展 [J]. 饲料研究, 2020, 43(10): 154-158.]
- [30] Hu H, Zhang X J, Quan S J, et al. Experimental study on *Lactobacillus plantarum* liquid fermentation of complete feed for piglets [J]. *Feed Research*, 2019, 42(8): 55-59. [胡虹, 张秀江, 权淑静, 等. 植物乳杆菌液体发酵仔猪全价饲料的试验研究 [J]. 饲料研究, 2019, 42(8): 55-59.]
- [31] Huang S J, Feng X R, Zhou Y. Application of compound microbial fermented feeds on tilapia breeding [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(8): 1003-1006. [黄世金, 俸祥仁, 周勇. 复合微生物发酵饲料在罗非鱼养殖中的应用研究 [J]. 南方农业学报, 2011, 42(8): 1003-1006.]
- [32] Yu J, Yu J, Chen X, et al. Effects of fermented protein feed on the growth performance of pond-raised crab [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2019, 4(4): 149-155.
- [33] Xu C Y, Chi C, Zheng X C, et al. Effects of fermented feed on the growth performance, oxidation resistance, immune function and protein metabolism of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(10): 2209-2217. [许晨远, 迟骋, 郑肖川, 等. 发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化、免疫和蛋白代谢的影响 [J]. 水产学报, 2019, 43(10): 2209-2217.]
- [34] Yan Q, Xie S, Zhu X, et al. Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(3): 163-169.
- [35] Shen J F, Chen M C, Liu H Y, et al. Effects of fish meal replacement by concentrated cottonseed protein on growth performance, serum biochemical indices, liver antioxidant indices and gastrointestinal tract protease activities of juvenile *Trachinotus ovatus* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(2): 746-756. [申建飞, 陈铭灿, 刘泓宇, 等. 浓缩棉籽蛋白替代鱼粉对卵形鲳鲹幼鱼生长性能、血清生化指标、肝脏抗氧化指标及胃肠道蛋白酶活性的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31(2): 746-756.]
- [36] Pan W, Miao L, Lin Y, et al. Regulation mechanism of oxidative stress induced by high glucose through PI3K/Akt/Nrf2 pathway in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017(70): 66-75.
- [37] Fawole F J, Sahu N P, Shamna N, et al. Effects of detoxified *Jatropha curcas* protein isolate on growth performance, nutrient digestibility and physio-metabolic response of *Labeo rohita* fingerlings [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(4): 1223-1233.
- [38] Yang J F, Hua X M, Guo Z H, et al. The replacement of fish meal and soybean meal to fermented soybean meal and its effects on the growth performance, serum biochemical indices, and immune gene expression in giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(4): 719-727. [杨景丰, 华雪铭, 郭子好, 等. 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长、血清生化及免疫基因表达的影响 [J]. 水生生物学报, 2018, 42(4): 719-727.]
- [39] Ray G W, Yang Q H, Tan B P, et al. Effects of replacing fishmeal with dietary wheat gluten meal (WGM) on growth, serum biochemical indices, and antioxidative

- functions, gut microbiota, histology and disease resistance for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2021(281): 115090.
- [40] Yang J, Zhang Z, Lin G, *et al.* Organic copper promoted copper accumulation and transport, enhanced low temperature tolerance and physiological health of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2023(32): 108459.
- [41] Yang W, Gu Z, Chen X, *et al.* Effects of phytase supplementation of high-plant-protein diets on growth, phosphorus utilization, antioxidant, and digestion in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2022(127): 797-803.
- [42] Chen X Y, Hu J R, Wang G X, *et al.* Effects of fish meal replacement by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on growth performance, serum biochemical indices and meat quality of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, **31**(6): 2788-2799. [陈晓瑛, 胡俊茹, 王国霞, 等. 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、肌肉品质及血清生化指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, **31**(6): 2788-2799.]
- [43] Kari Z A, Kabir M A, Mat Z, *et al.* The possibility of replacing fish meal with fermented soy pulp on the growth performance, blood biochemistry, liver, and intestinal morphology of African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2021(21): 100815.
- [44] Zhou D, Wang C, Zheng J, *et al.* Dietary thiamine modulates carbohydrate metabolism, antioxidant status, and alleviates hypoxia stress in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2022(131): 42-53.
- [45] Zhou X, Tian Z, Wang Y, *et al.* Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010(36): 501-509.
- [46] Wang Z, He Z, Emara A M, *et al.* Effects of malondialdehyde as a byproduct of lipid oxidation on protein oxidation in rabbit meat [J]. *Food Chemistry*, 2019(288): 405-412.
- [47] Yang S H. Effect of fermented biological feed on growth performance, digestive enzyme and immune enzyme activity of *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Foshan: Foshan University, 2017: 25-30. [杨树浩. 生物发酵饲料对罗氏沼虾生长性能、消化酶和免疫酶活性的影响 [D]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2017: 25-30.]
- [48] Zhao Y L, Li Y J, Guo Z X, *et al.* Effect of fermented feed on growth performance, digestion, immunity and antioxidant capacity of *Cobitis taenis* [J]. *Feed Research*, 2021, **44**(23): 59-62. [赵云龙, 李艳娇, 郭志欣, 等. 发酵饲料对花鳅生长性能、消化、免疫和抗氧化能力的影响 [J]. 饲料研究, 2021, **44**(23): 59-62.]
- [49] Li L, Song J, Peng C, *et al.* Co-occurrence network of microbes linking growth and immunity parameters with the gut microbiota in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after feeding with fermented soybean meal [J]. *Aquaculture Reports*, 2022(26): 101280.
- [50] Han F, Qian J, Qu Y, *et al.* Partial replacement of soybean meal with fermented cottonseed meal in a low fishmeal diet improves the growth, digestion and intestinal microbiota of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Reports*, 2022(27): 101339.
- [51] Holt C C, Bass D, Stentiford G D, *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021(186): 107387.
- [52] Zhang M, Pan L, Fan D, *et al.* Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2021(530): 735703.
- [53] Yao H X, Chen X R, Yuan H W, *et al.* Effects of fermented feed on growth performance, muscle quality, antioxidant capacity and intestinal microflora of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J/OL]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 1-15. [姚海行, 陈效儒, 袁汉文, 等. 发酵饲料对克氏原螯虾生长性能、肌肉品质、抗氧化能力和肠道微生物群落的影响 [J/OL]. 水产学报, 2022, 1-15.]
- [54] Binda C, Lopetuso L R, Rizzatti G, *et al.* Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2018, **50**(5): 421-428.
- [55] Wang X, Pan J, Chen L, *et al.* Prevalence, virulence-related genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. from loach *Misgurnus anguillicaudatus* with skin ulcer and healthy controls in Southern China [J]. *Aquaculture*, 2022(552): 738040.
- [56] Huang H, Zhou P, Chen P, *et al.* Alteration of the gut microbiome and immune factors of grass carp infected with *Aeromonas veronii* and screening of an antagonistic bacterial strain (*Streptomyces flavotricini*) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020(143): 104092.
- [57] Wang Z H, Li J Z, Wang D, *et al.* Research status and problems of probiotic *Bacillus* in aquaculture [J]. *Feed Research*, 2018(1): 1-4+8. [王振华, 李建臻, 王迪, 等. 益生芽孢杆菌在水产养殖中研究现状及存在问题 [J]. 饲料研究, 2018(1): 1-4+8.]
- [58] Sam-on M F S, Mustafa S, Termizi Yusof M, *et al.* Evaluation of three *Bacillus* spp. isolated from the gut of giant freshwater prawn as potential probiotics against pathogens causing Vibriosis and Aeromonosis [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022(164): 105417.
- [59] Lu G Z. Isolation, purification and preliminary identification of effective antimicrobial substances from *Bacillus cereus* [D]. Yantai: Yantai University, 2021: 28-39. [卢国柱. 蜡芽孢杆菌中有效抗菌物质的分离、纯化及初步鉴定 [D]. 烟台: 烟台大学, 2021: 28-39.]

FERMENTED FEED ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT CAPACITY AND INTESTINAL MICROORGANISMS OF *MACROBRACHIUM NIPPONENSE*

LI Zheng-Zhong¹, LIU Bo^{1,2,3}, LIU Zhi-Hua³, SUN Cun-Xin², ZHOU Qun-Lan², ZHENG Xiao-Chuan²,
SUN Mei⁴ and GAO Liang⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Wuxi Fisheries College of Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China; 4. Jiangsu Suwei Microorganism Research Co., Ltd, Wuxi 214063, China)

Abstract: In order to explore the effects of fermented feed on growth performance, antioxidant capacity and intestinal microorganisms of *Macrobrachium nipponense*, five experimental groups were designed as follow: L1 group (100% basal feed), L2 group (87.5% basal feed +12.5% fermented feed), L3 group (75% basal feed +25% fermented feed), L4 group (50% basal feed +50% fermented feed) and L5 group (100% fermented feed). *M. nipponense* of (0.09±0.01) g with similar size was selected for 56d culture experiment. The results showed that the contents of soluble protein and small peptide in the compound feed were significantly increased after feed fermentation ($P<0.05$), the number of beneficial bacteria was significantly increased, and the number of mold was inhibited after feed fermentation. The results of culture experiment showed that the survival rate of all groups was above 80%, and there was no significant difference ($P>0.05$). The weight gain rate was increased first and then decreased. The weight gain rate of L3 and L4 group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), and the feed conversion ratio of L3 group was significantly lower than that of control group ($P<0.05$). The SOD activity of L3, L4 and L5 groups was significantly higher than that of L1 group ($P<0.05$), the MDA content of L2, L3 and L4 groups was significantly lower than that of L1 group ($P<0.05$), the superoxide anion clearance rate of L2 and L5 was significantly higher than L1 group ($P<0.05$), and the superoxide anion clearance rate of L4 group was significantly lower than that of L1 group ($P<0.05$). The contents of serum ALT, AST and ALB were significantly lower than that of control group ($P<0.05$), and the content of RUEA in L1 and L2 groups was significantly higher than that of other groups ($P<0.05$). GLU content in L2, L3 and L4 groups was significantly higher than that of L1 group ($P<0.05$). There were no significant differences in the contents of total triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and total protein (TP) among all groups ($P>0.05$). The intestinal microbial results showed that the OTU number, Observed species index, Shannon index, and Chao1 index of group L3 were higher than that of group L1 ($P<0.05$). PCA results showed that the community structure between group L1 and L3 was significantly different. At the genus level, the abundance of *Aeromonas* in group L1 was significantly higher than that in group L3 ($P<0.05$), and the abundance of *Diverbacter* and *Bacillus* in group L3 was significantly higher than that of group L1 ($P<0.05$). These results indicated that fermented diet could increase nutrient content, weight gain rate, reduce feed conversion ratio, improve antioxidant capacity and intestinal microbial community structure, and inhibit pathogenic bacteria in prawns. The suitable addition ratio of fermented feed is about 25%.

Key words: Fermented feed; Growth performance; Antioxidant capacity; Gut microbe; *Macrobrachium nipponense*