

文章编号: 1000-0615(2019)10-2241-15

DOI: 10.11964/jfc.20190911949

黑水虻油替代豆油对草鱼生长性能、抗氧化能力和肠道菌群的影响

陈延娜¹, 卢荣华^{1*}, 杨国坤¹, 张玉茹¹,
秦超彬¹, 吉红², 聂国兴^{1*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为研究黑水虻油替代豆油在草鱼生产实践中的效果, 本实验以黑水虻油替代草鱼基础饲料中0(SO)、25%(BSO25)、50%(BSO50)、75%(BSO75)和100%(BSO100)的豆油并配制成5种等氮等脂的饲料, 饲喂草鱼[初始体质量(13.37±1.07 g)]56 d后检测生长性能、体成分、血清生化指标、抗氧化能力、肠道和肝脏组织结构及肠道菌群组成等变化。结果显示, 各组之间草鱼增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、饲料系数(FCR)、肥满度(CF)、脏体比(VSI)和肝体比(HSI)变化均不显著。与SO组相比, BSO25和BSO50组血清超氧化物歧化酶(SOD)活性显著增加, SM75和SM100组的丙二醛(MDA)含量均显著降低, BSO50、BSO75和BSO100组的过氧化氢酶(CAT)活性均显著上升。BSO100组肝细胞呈现为不规则形状, 血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)及低密度脂蛋白(LDL-C)的水平均显著高于SO组。BSO100组群落多样性指数Sobs、Shannon和丰富度指数Chao、Ace均显著高于SO组。研究表明, 在本实验条件下, 黑水虻油替代饲料中100%的豆油虽然不会影响草鱼的生长, 能提高草鱼抗氧化能力及肠道菌群的丰度和多样性, 但在BSO100组中, 草鱼肝脏受损, 长期饲喂会对机体产生不利影响, 因此在草鱼饲料中黑水虻油不应全部替代豆油, 建议替代比例不超过75%。

关键词: 草鱼; 黑水虻油; 豆油; 生长性能; 抗氧化能力; 肠道菌群组成

中图分类号: S 963

文献标志码: A

大豆油是饲料中最常用的油脂成分之一, 但其价格每年都在增加, 而非转基因大豆的供应量有限^[1]。此外, 大豆的大量使用也造成了严重的环境问题, 如大豆种植量的增加导致森林过度砍伐^[2], 耗水量增加^[3], 以及农药和化肥过度使用等^[2], 这严重限制了大豆油在水产饲料中的应用。因此, 水产饲料行业迫切需要寻找新的、优质价廉的脂肪源饲料。

昆虫因具有资源可再生性、生长速率快、易于繁殖、养殖成本低和可利用有机废物等优点而受到研究者的广泛关注, 已将其作为部分

陆生和水生动物的饲料原料^[4-5]。据报道, 黑水虻(*Hermetia illucens*)幼虫的粗脂肪含量为15%~49%^[5-6], 其体内含有丰富的多不饱和脂肪酸, 其不饱和程度与鱼油相似^[7], 脂肪酸种类主要为油酸、亚油酸和棕榈酸^[8]。在对建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)的研究中发现, 黑水虻油可以全部替代豆油, 提高肌肉中高不饱和脂肪酸含量, 降低腹脂沉积^[9]。Dumas等^[10]在对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究中发现, 饲料中添加10%的黑水虻油, 可提高其生长性能和饲料利用率。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)具有生长速率

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2019-09-26

资助项目: 国家自然科学基金(31402311, 31672671, 31872581); NSFC-河南联合基金(U1704109); 河南省重点科技攻关项目(国家科技合作领域)(182102410031)

通信作者: 卢荣华, E-mail: laoiyika@hotmail.com; 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

快、肉质鲜美和饲料来源广等优点,是我国淡水养殖产量最高的经济鱼类,2018年养殖产量达550.43万t(2019中国渔业统计年鉴^[11])。但黑水虻油在草鱼饲料中的应用研究目前尚未见报道。因此,本研究拟评估草鱼饲料中添加黑水虻油的效果,探讨黑水虻油对草鱼生长性能、饲料利用率、血清生化参数、肠道和肝脏组织结构及肠道菌群组成等的影响,以确定黑水虻油的最佳替代水平,为养殖鱼类饲料中使用黑水虻油作为饲料脂肪源提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料及原料

配制5种等氮等脂的实验饲料。黑水虻幼虫由广州无两生物科技有限公司提供,采用超临界二氧化碳萃取法获取黑水虻油。黑水虻油替代豆油的量为0(SO)、25%(BSO25)、50%(BSO50)、75%(BSO75)和100%(BSO100)5个水平。使用河南师范大学水产学院的饲料车间设备制作饲料。将饲料原料粉碎,过40目筛,采用逐级扩大法将原料混匀,并将其制成直径为1.5 mm的颗粒饲料。在阴凉通风处风干,并于-20 °C冰箱中储藏备用,其组成及营养水平如表1,表2所示。

1.2 饲养管理

草鱼购自新乡延津渔场,用高锰酸钾(KMnO₄, 0.01%)溶液短暂消毒处理,在河南师范大学水产基地小型水泥池中暂养2周,期间投喂商品饲料(河南康达尔农牧科技有限公司)。养殖实验在河南师范大学水产学院地下循环水养殖系统中进行。待草鱼稳定并适应养殖环境后,随机挑选450尾实验鱼[初始体质量为(13.37±1.07 g)]分配至15个养殖桶中,养殖56 d。实验共设5个组,每组3个重复,每个重复30尾鱼,每天饱食投喂3次(8:30、13:30和18:30)。养殖桶体积为130 L,直径为52 cm,高为62 cm。水流速为6 L/min,采用气石提供氧气。养殖期间12 h光照,12 h黑暗,每日换水1次,换水量为养殖水体积的1/3,水温维持在(26.3±1) °C, pH为6.5~7.8,溶解氧6~8 mg/L。

1.3 样品采集

养殖实验结束后,使用MS-222(100 mg/L)麻醉处死草鱼。每桶选取3尾草鱼进行称重和体长测量,并解剖分离出内脏。每桶选取9尾草鱼进行尾静脉处抽血,置于2 mL离心管中,4 °C放置

过夜,3 500 r/min离心15 min,吸取上清液即为检测所需的血清。每桶选取6尾草鱼,无菌环境下解剖,用无菌手术刀刮取肠道内容物(约200 mg),于5 mL无菌离心管中混合,然后分装于2个2 mL无菌离心管中,液氮速冻后于-80 °C保存,用于肠道菌群基因组DNA提取。

1.4 生长性能的测定

生长及生物学性状计算公式:

增重率(WGR, %)=(末体质量-初体质量)/初体质量×100%

特定生长率(SGR, %/d)=(ln末体质量-ln初体质量)/饲喂天数×100%

饲料系数(FCR)=每个重复饲料消耗量/(鱼末体质量+死亡鱼重-鱼初体质量)

肥满度(CF, g/cm³)=体质量/体长的立方×100

内脏指数(VSI, %)=内脏重/鱼体质量×100%

肝脏指数(HSI, %)=肝胰脏重/鱼体质量×100%

1.5 常规成分测定

采集组织样品,每个处理取3尾鱼的肝脏和肌肉组织。组织中水分、灰分、粗蛋白及粗脂肪含量分别采用恒重法、550 °C马弗炉灼烧法、凯氏定氮法和索氏抽提法测定。

1.6 血清生化指标及抗氧化酶活性的测定

每个处理选取9个样品,采用ADVIA[®] 2400 Chemistry System分析仪分别测定草鱼血清生化指标(河南新乡雅士杰医学检验所),包括总蛋白(TP, g/L)、白蛋白(ALB, g/L)、球蛋白(GLB, g/L)、白球比(A/G)、谷丙转氨酶(ALT, U/mL)、谷草转氨酶(AST, U/mL)、葡萄糖(Glu, mmol/L)、胆固醇(TC, mmol/L)、甘油三酯(TG, mmol/L)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C, mmol/L)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, mmol/L)。用试剂盒检测血清中丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性(南京建成生物工程研究所,南京)。

1.7 肝脏和肠道的组织学观察

每个处理取4尾鱼,剪取1 cm中肠肠道和肝脏组织,放入含4%多聚甲醛溶液的离心管中,室温保存,制作肠道及肝脏组织切片,用倒置

表 1 实验原料及饲料常规组分组成

Tab. 1 Ingredients and proximate composition of the experimental diets

项目 items	实验组 experimental groups				
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100
原料/(g/kg) ingredients					
豆粕 soybean meal	190	190	190	190	190
鱼粉 fish meal	100	100	100	100	100
菜粕 rapeseed meal	210	210	210	210	210
棉粕 cottonseed meal	120	120	120	120	120
米糠 rice bran meal	105.50	105.50	105.50	105.50	105.50
面粉 wheat flour	179	179	179	179	179
黑水虻油 <i>H. illucens</i> larvae oil	0	6	12	18	24
豆油 soybean oil	24	18	12	6	0
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	20	20	20	20	20
多维 vitamin premix ^a	3	3	3	3	3
多矿 mineral premix ^b	25	25	25	25	25
膨润土 bentonite	23	23	23	23	23
抗氧化剂 antioxidant	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
常规组分组成/% proximate composition					
粗蛋白 crude protein	32.24	32.69	32.75	32.66	32.88
粗脂肪 crude lipid	5.11	5.13	5.15	5.20	5.35
灰分 ash	11.55	12.75	13.55	13.83	14.83
水分 moisture	10.65	10.68	10.46	10.89	10.39

注: a. 维生素预混料为每kg饲料提供, 维生素A 800 000 IU, 维生素D₃ 160 000 IU, 维生素E 15 g, 维生素K₃ 325 mg, 维生素B₁ 1 500 mg, 维生素B₂ 1 250 mg, 维生素B₆ 1 100 mg, 维生素B₁₂ 4 mg, 维生素C 2.5 mg, 肌酸5.5 g, 叶酸70 mg, 生物素125 mg, 烟酸4 mg, 泛钙4.5 g。b. 矿物质预混料为每kg饲料提供, 磷105 g, 钙330 g, 镁45 g, 铁15 g, 碘50 mg, 硒9 mg, 铜0.35 g, 锌3 g, 锰1.5 g, 钴11 mg

Noets: a. vitamin premix (/kg in premix): vitamin A 800 000 IU, vitamin D₃ 160 000 IU, vitamin E 15 g, vitamin K₃ 325 mg, vitamin B₁ 1 500 mg, vitamin B₂ 1 250 mg, vitamin B₆ 1 100 mg, vitamin B₁₂ 4 mg, vitamin C 2.5 g, creatine 5.5 g, folic acid 70 mg, biotin 125 mg, nicotinic acid 4 g, D-pantothenic acid 4.5 g. b. mineral premix (/kg in premix): P 105 g, Ca 330 g, Mg 45 g, Fe 15 g, I 50 mg, Se 9 mg, Cu 0.35 g, Zn 3 g, Mn 1.5 g, Co 11 mg

显微镜对切片进行拍照观察, 并测量其肠道绒毛长度及肠壁厚度。切片制作过程: 剪取适宜长度的中肠段, 使用0.1 mol/L的PBS冲洗3遍以去除肠道内容物, 酒精棉球擦拭肠道表面以去除表面脂肪, 放入2.5%的戊二醛溶液进行固定并过夜, 然后依次通过30%、50%、70%、80%和90%的乙醇溶液, 无水乙醇进行脱水处理, 脱水后加入叔丁醇于4 °C放置30 min, 待液体凝固后放入真空干燥器中干燥处理, 喷金处理后在扫描电子显微镜下观察和拍照。

1.8 基于基因组DNA的肠道菌群16S rRNA高通量测序

采用DNA提取试剂盒(QIAamp, Germany)提

取各组样品的DNA, 具体步骤见说明书。使用超微量分光光度计(NanoDrop, 美国)检测DNA浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。当样品DNA浓度 $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 总量 $\geq 1 \mu\text{g}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.8\sim 2.0$ 并确保DNA条带单一无降解、无污染时, 则认为样品符合要求。将检测合格样品送往上海美吉生物医药科技有限公司(上海)进行16S rRNA高通量测序。

1.9 数据处理

本实验数据均以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析, 然后用Duncan氏法进行多重检验, 当 $P<0.05$ 时,

表 2 实验饲料和黑水虻幼虫油脂酸组成

Tab. 2 Fatty acid composition of experimental diets and black soldier fly larvae oil(BSO)

脂肪酸 fatty acids	实验组 experimental groups					
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100	BSO
C12:0	1.05	1.51	2.01	2.69	3.39	11.28
C14:0	0.10	0.10	0.13	0.10	0.14	0.09
C16:0	14.59	15.11	15.66	16.48	17.54	25.26
C16:1	1.07	1.40	1.55	1.78	2.20	2.60
C18:0	3.13	3.09	2.90	2.80	2.72	4.11
C18:1n9	17.46	20.94	18.17	21.54	23.09	21.22
C18:1n7	12.64	9.83	13.99	11.40	10.35	7.92
C18:2n6	40.65	38.21	35.63	33.43	30.69	21.79
C18:3n6	0.51	0.45	0.39	0.40	0.41	0.36
C18:3n3	4.24	4.10	4.11	3.89	3.50	2.01
C20:0	0.40	0.46	0.42	0.54	0.61	1.97
C20:2	0.25	0.37	0.26	0.24	0.40	0.46
C20:3n6	0.25	0.23	0.29	0.24	0.31	0.10
C20:4n6	0.16	0.16	0.26	0.17	0.23	0.28
C20:5n3	1.58	1.84	1.83	1.88	2.03	0.37
C22:6n3	1.91	2.18	2.41	2.43	2.41	0.21
ΣSFA	19.27	20.28	21.12	22.62	24.40	42.72
Σ MUFA	31.18	32.18	33.70	34.71	35.63	31.74
Σn3 PUFA	7.73	8.13	8.35	8.19	7.94	2.59
Σn6 PUFA	41.57	39.05	36.57	34.24	31.64	22.52
n3/n6	0.19	0.21	0.23	0.24	0.25	0.12

认为数据差异显著。高通量生物信息学分析通过<https://www.i-sanger.com>云平台进行分析。

2 结果

2.1 黑水虻油对草鱼生长性能的影响

WGR、FCR和SGR在各组间均无差异($P>0.05$); BSO50和BSO100组的CF稍高于SO组; 相对于SO组, BSO100组的VSI与HIS均达到最大值(11.54%, 2.44%)(表3)。总体上, 各组之间草鱼WGR、SGR、FCR、CF、VSI和HSI变化均不显著($P>0.05$)。

2.2 黑水虻油对草鱼肝脏和肌肉常规成分的影响

在肌肉组织中, 处理组的粗蛋白含量均大于对照组, 而粗脂肪含量均小于对照组(表4)。

BSO50与BSO100组的灰分含量达到最大值。在肝脏组织中, 处理组的粗蛋白含量均大于对照组, 而随着替代浓度的增加, 粗脂肪的含量出现先升高后降低的趋势。总体上, 黑水虻油替代豆油对草鱼肝脏和肌肉中水分、灰分、粗蛋白和粗脂肪含量均未产生显著影响($P>0.05$)。

2.3 黑水虻油对草鱼血清生化指标的影响

各组之间TP、ALB、GLB、A/G、TC、TG、HDL-C等差异均不显著($P>0.05$)(表5)。而BSO100组LDL-C、ALT、AST和Glu的量均显著高于对照组($P<0.05$)。

2.4 黑水虻油对草鱼血清抗氧化酶活性的影响

BSO25组与BSO50组SOD活性显著高于对照组($P<0.05$), BSO100组显著低于对照组($P<0.05$)。处理组中CAT活性均高于对照组, 且当替代浓度

表 3 黑水虻油对草鱼生长性能和生物学指数的影响

Tab. 3 Effect of BSO on growth performance and biological indices of *C. idella*

项目 items	实验组 experimental groups				
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100
初体质量/g IBW	13.40±0.15	13.40±0.13	13.49±0.22	13.31±0.16	13.27±0.39
末体质量/g FBW	46.40±0.71	46.30±0.45	46.60±0.75	46.00±0.56	45.84±1.34
增重率/% WGR	2.46±0.00	2.46±0.00	2.46±0.00	2.46±0.00	2.46±0.00
特定增长率/(%/d) SGR	2.07±0.00	2.07±0.00	2.07±0.00	2.07±0.00	2.07±0.00
饲料系数 FCR	1.58±0.01	1.58±0.00	1.58±0.01	1.58±0.00	1.58±0.01
肥满度/(g/cm ³) CF	1.99±0.07	1.96±0.12	2.02±0.11	1.95±0.08	2.03±0.21
脏体比/% VSI	11.40±0.96	9.74±0.75	10.93±1.36	10.55±0.90	11.54±1.34
肝体比/% HSI	1.94±0.57	1.60±0.47	2.00±0.40	2.01±0.49	2.44±0.71

表 4 黑水虻油对草鱼组织常规组分的影响

Tab. 4 Effect of BSO on proximate composition in tissues of *C. idella*

%

项目 items	实验组 experimental groups				
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100
肌肉 muscle					
水分 moisture	79.83±0.86	79.73±0.82	79.65±0.58	79.68±0.98	79.91±1.20
粗蛋白 crude protein	17.33±1.12	17.54±1.09	17.42±0.68	17.64±0.57	17.38±0.19
粗脂肪 crude lipid	2.16±0.02	1.78±0.01	1.73±0.01	2.05±0.04	1.5±0.01
灰分 ash	0.80±0.01	0.80±0.01	1.00±0.01	0.8±0.01	1.00±0.01
肝脏 hepatopancreas					
水分 moisture	73.23±0.86	73.63±0.82	72.55±0.58	73.48±0.98	74.31±1.20
粗蛋白 crude protein	16.68±0.29	16.96±0.76	16.93±0.25	17.48±0.17	17.05±0.01
粗脂肪 crude lipid	15.12±0.13	15.20±0.09	15.30±0.07	14.20±0.01	14.36±0.08
灰分 ash	0.60±0.01	0.60±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01

大于25%时, CAT活性显著增强($P<0.05$)。BSO25组、BSO50组与对照组之间MDA含量无显著性差异($P>0.05$), 而BSO75组、BSO100组显著低于对照组($P<0.05$)(表5)。

2.5 黑水虻油对草鱼肝脏和肠道组织结构的影响

扫描电镜下对草鱼中肠切片进行拍照与测量, 统计各组的中肠绒毛高度(μm)与肌层厚度(μm)并绘制柱形图(图版 I, 图1)。与对照组相比, 各处理组肠绒毛高度和肠壁厚度并没有发生显著性变化($P>0.05$)。与对照组相比, BSO25、BSO50和 BSO75组微绒毛成簇状排列且较密集,

而BSO100组绒毛与对照组相似, 微绒毛排列杂乱且较稀疏(图版 II)。

当替代浓度低于75%时, 肝细胞体积大, 呈多边形、界限清楚, 细胞核大而圆, 位于肝细胞中央; 而在BSO100组, 肝细胞大多为不规则形状, 细胞与细胞之间的界限不清晰, 细胞核变小, 细胞排列不规则(图版 III)。

2.6 黑水虻油对草鱼肠道菌群的影响

Coverage指数在各组之间没有显著性差异($P>0.05$), 群落多样性指数Sobs、Shannon随着黑水虻油的添加呈现上升趋势, 且BSO100组显著高于对照组($P<0.05$)。代表丰富度水平的Chao、

表5 黑水虻油替代豆油对草鱼血清生化及抗氧化性能的影响

Tab. 5 Effect of replacement of SO with BSO on serum biochemical parameters and antioxidant indices of *C. idella*

项目 items	实验组 experimental groups				
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100
总蛋白/(g/L) TP	31.86±1.68	33.11±2.15	32.33±1.73	32.22±1.48	33.00±1.66
白蛋白/(g/L) ALB	15.57±1.62	16.13±1.46	15.44±1.59	14.78±1.30	15.67±1.87
球蛋白/(U/mL) GLB	16.29±0.49	17.89±2.98	16.89±1.54	17.44±1.33	17.33±1.50
白球比/(%) A/G	0.96±0.10	0.95±0.10	0.92±0.14	0.85±0.12	0.92±0.19
谷丙转氨酶/(U/mL) ALT	3.00±1.41 ^a	4.00±1.51 ^a	5.13±2.23 ^{ab}	5.11±2.80 ^{ab}	6.78±3.07 ^b
谷草转氨酶/(U/mL) AST	67.00±15.23 ^a	75.29±14.43 ^{ab}	85.78±15.57 ^{ab}	81.67±26.85 ^{ab}	91.67±19.63 ^b
葡萄糖/(mmol/L) Glu	3.72±0.82 ^a	4.61±1.29 ^{ab}	4.89±1.48 ^{ab}	4.91±0.87 ^{ab}	5.37±1.90 ^b
总胆固醇/(mmol/L) TC	5.70±0.24	6.04±0.49	5.83±0.64	5.96±0.53	6.10±0.52
甘油三酯/(mmol/L) TG	5.37±0.50	5.44±0.60	5.54±0.85	5.45±0.39	5.55±0.61
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL-C	3.68±0.12	3.86±0.29	3.56±0.62	3.73±0.29	3.79±0.43
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL-C	0.20±0.12 ^a	0.31±0.25 ^{ab}	0.46±0.28 ^{ab}	0.45±0.24 ^{ab}	0.49±0.25 ^b
抗氧化指标 antioxidant indexes					
丙二醛/(nmol/mL) MDA	437.73±27.66 ^a	426.73±42.11 ^a	454.66±24.70 ^a	376.69±48.32 ^b	335.26±8.01 ^b
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	1.30±0.26 ^a	1.83±0.12 ^{ab}	3.44±0.07 ^c	2.77±0.70 ^{bc}	4.02±1.08 ^c
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	2.76±0.03 ^a	3.02±0.02 ^b	2.84±0.02 ^c	2.77±0.04 ^a	2.66±0.01 ^d

注：同行中标有不同小写字母者表示组间有显著性差异($P < 0.05$)，下同

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

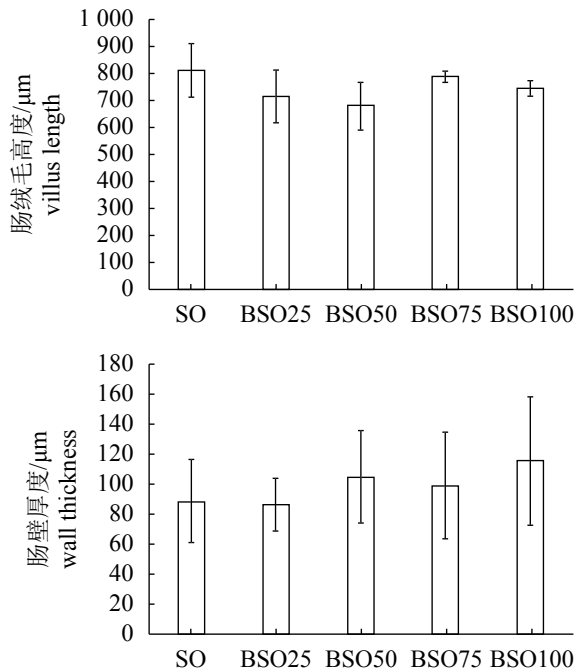


图1 用BSO替代SO对草鱼肠道形态的影响

Fig. 1 Effect of replacement SO with BSO on intestinal morphology of *C. idella*

Ace指数也出现了相同的趋势，且BSO75组、BSO100组显著高于对照组(表6)。

对所有样品在OTU水平上进行Venn图分析，实验组独有的OTU个数分别为64、71、41、160、98；实验组共有的OUT个数为341(图2)。各组样品在门水平上的菌群相对丰度没有出现显著性的变化($P > 0.05$)(图3)。但在草鱼肠道中厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)属于优势菌群，此外，实验组厚壁菌与拟杆菌的比值(F/B)明显高于对照组(图4)。

3 讨论

本研究发现，黑水虻油替代豆油不会影响草鱼的生长性能。在对建鲤的研究中，发现黑水虻油替代100%豆油对生长性能没有显著性影响^[9]；在对虹鳟的研究中也发现，在饲料中添加10%的黑水虻油替代鱼油并没有影响其生长性能^[12]；在对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究中，用

表 6 各样品肠道微生物多样性分析结果

Tab. 6 Results of intestinal microbial diversity analysis of each sample

项目 items	实验组 experimental groups				
	SO	BSO25	BSO50	BSO75	BSO100
物种多样性 community diversity					
丰度观测值 Sobs	304.50±125.34 ^a	322.75±140.11 ^a	373.25±77.56 ^{ab}	472.25±126.35 ^{ab}	507.25±45.59 ^b
香农指数 Shannon index	2.78±0.57 ^a	3.02±0.55 ^a	3.14±0.58 ^{ab}	3.28±1.02 ^{ab}	4.10±0.18 ^b
辛普森指数 Simpson index	0.13±0.06	0.10±0.04	0.11±0.06	0.16±0.18	0.05±0.01
覆盖率 coverage	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
物种丰度 community richness					
丰度Chao1数 Chao1	374.44±127.98 ^a	368.81±136.98 ^a	468.86±69.25 ^{ab}	564.47±134.92 ^b	567.85±71.39 ^b
丰度ACE指数 Ace	380.29±120.86 ^a	372.82±142.58 ^a	492.40±62.04 ^{ab}	563.72±140.68 ^b	564.32±65.93 ^b

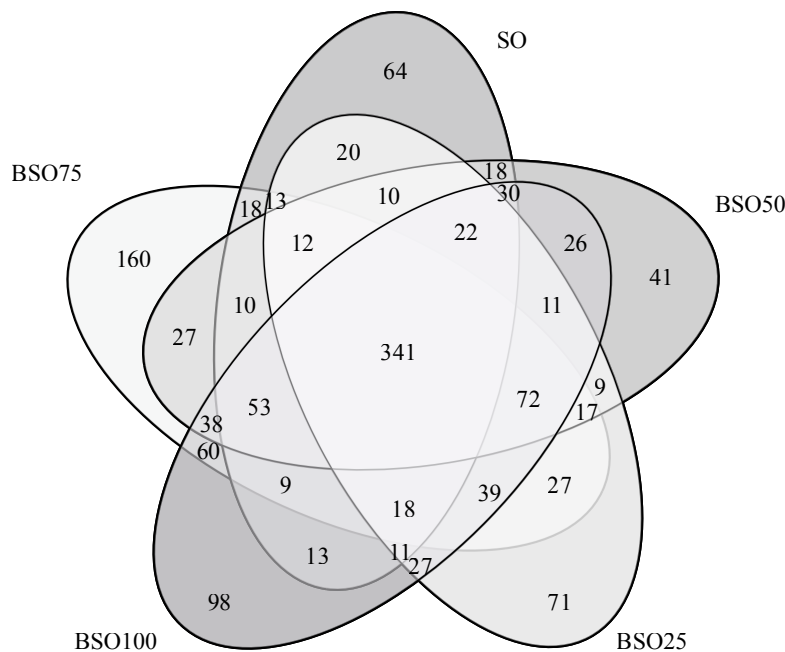


图 2 展示所有实验组独有和共有OUT的Venn图

Fig. 2 Venn diagram showing the unique and shared OTUs in all groups

黑水虻油替代菜籽油不会影响其生长性能^[13]。本研究发现, 各个实验组的采食量没有出现显著性的差异, 说明各组饲料的适口性良好, 这可能是草鱼生长性能没有受到影响的原因之一。月桂酸是黑水虻油主要的脂肪酸之一^[14], 并且是很好的供能物质, 能很快被水解吸收并转移至肝脏进行氧化利用^[15], 这可能是草鱼生长良好的另一个原因。

本研究发现草鱼肝脏和肌肉常规组份含量在各组之间均没有显著性差异。在建鲤和肉鸡

中也得到了相似的结果^[1, 9]。同样的, Belghit等^[13]研究发现, 在大西洋鲑饲料中用黑水虻油替代植物油, 鱼体粗蛋白、粗脂肪、氨基酸和矿物质含量没有受到显著影响。用黄粉虫油和大麦虫油替代豆油, 并不会影响肉鸡的生长性能和对营养物质的消化率^[1]。推测可能是因为鱼的常规组份受到内源性物质的调节, 因此机体组份在应激条件下相对恒定, 且不受饲料变化的影响^[10, 16]。然而, Dumas^[12]在对虹鳟的研究中发现, 饲料中添加5%的黑水虻油替代豆油显著提

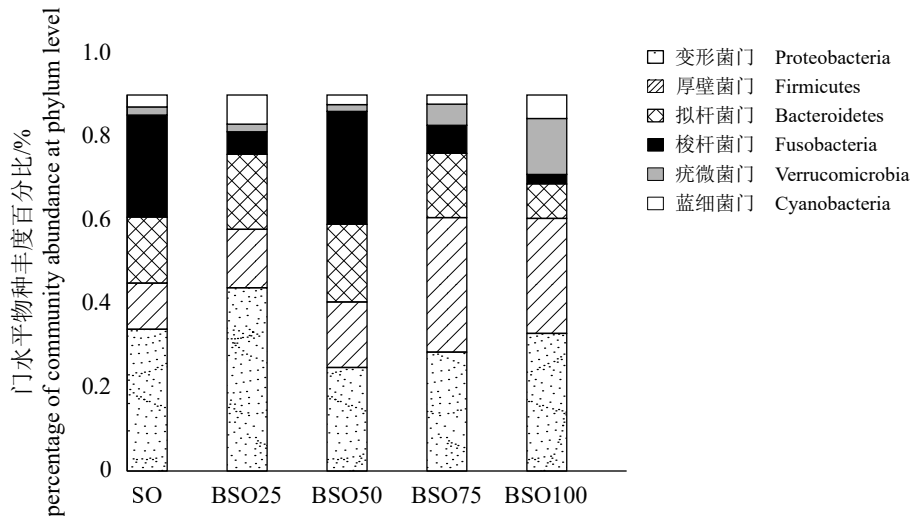


图3 不同细菌门的分布柱状图

Fig. 3 Distribution histogram of different bacterial phyla

高了全鱼粗脂肪的含量，但肌肉中的常规组份没有受到黑水虻油的影响。这些差异可能是由于实验对象及规格、饲料配方和油的替代比例不同引起的。

血清生化指标是评价鱼类健康水平的重要指标之一，GLB能够调节机体的免疫反应^[17]。在本研究中，各个组的GLB含量没有显著差异，这提示饲料中添加黑水虻油可能不会影响鱼体的免疫力，此结果在虹鳟中也得到了证实^[12]。AST和ALT是肝脏健康受损的标志之一，其活性随着肝脏受损程度的增加而升高^[18-20]。本实验发现，草鱼血清中的ALT、AST活性在BSO100处理组中显著高于对照组，说明草鱼的肝脏有可能受到损伤。因此100%的替代比例虽然不影响草鱼的生长指标，但对肝脏产生负面影响，长期饲喂可能会影响草鱼的生长性能。LDL运输胆固醇从肝脏到全身的各个组织^[21]，这会增加血液中的胆固醇水平，本实验结果显示随着黑水虻油替代水平的升高，草鱼血清中的LDL含量明显升高。上述结果提示黑水虻油替代豆油的比例应低于100%。

细胞代谢时，需氧动物产生的活性氧(ROS)会导致细胞和组织损伤^[22]。正常情况下，自由基的产生和清除存在一种平衡的状态，当这种平衡发生改变时，机体会产生一些抗氧化防御机制，从而减少氧化应激并维持自由基的平衡^[23]。SOD和CAT等自由基清除酶可保护细胞免受ROS的损伤，MDA是脂质过氧化的最终产

物，其浓度可作为脂质过氧化的测量指标^[24]。Yuan等^[25]在研究不同脂肪源对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的影响中发现，棕榈油组蟹肝胰腺谷胱甘肽(GSH)含量及血清总抗氧化能力(T-AOC)均显著高于豆油组，而MDA含量低于豆油组，这与本实验的结果类似。以上结果表明用黑水虻油替代豆油可能对草鱼的抗氧化能力具有促进作用。昆虫的外壳含有丰富的几丁质，而几丁质能提高机体的抗氧化能力^[5, 26-28]，本研究中抗氧化能力的提高是否与几丁质有关仍未完全明晰，有待进一步研究。

以往的研究表明，饮食因素^[29-30]可能会干扰鱼体肠内的稳态和结构特征。肠道是食物消化、吸收和运输的主要器官，肠道功能对营养物质的吸收非常重要^[31]，可通过测量绒毛来评估肠道的健康和功能^[32]。此外，肝脏的状态也可以反映出鱼类的营养状况和饲料质量^[33]。肝细胞的大小和肝脏的形状随摄食营养物质成分的不同而变化^[34-35]。本研究中，添加黑水虻油不会影响草鱼肠绒毛高度和肌层厚度。在对虹鳟的研究中发现，相对于对照组，用黑水虻油替代鱼油对鱼体前肠和后肠的绒毛宽度和长度没有显著影响^[12]。目前的研究发现，BSO100处理组的肝脏组织发生了变化，这与BSO100处理组血清中AST、ALT的含量显著升高的结果相吻合，提示在草鱼饲料中黑水虻油的替代比例应低于100%。

Coverage指数在各组中均大于99.90%，说明各组样品均达到测序要求，能够反映肠道菌群

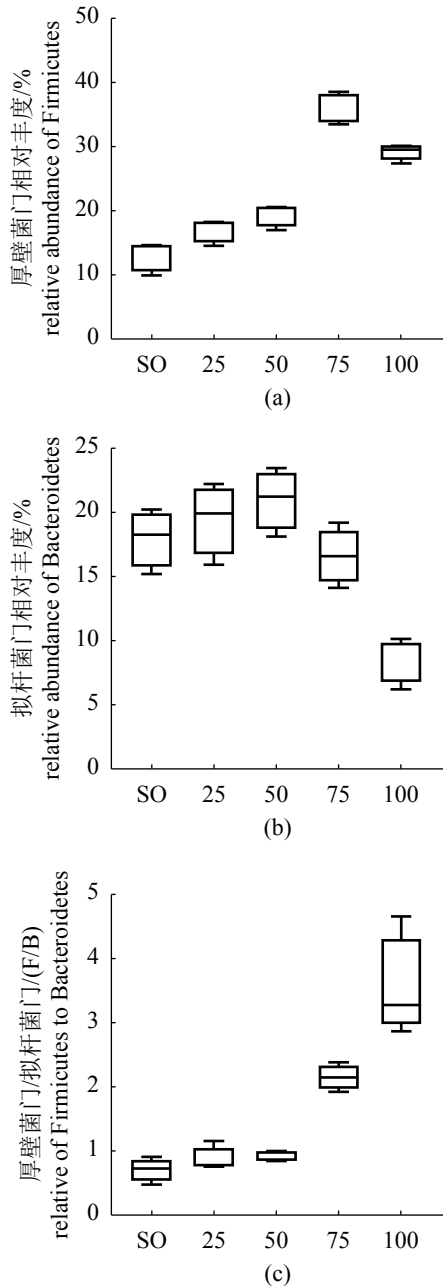


图4 厚壁菌门的相对丰度(a), 拟杆菌门的相对丰度(b), 厚壁菌门与拟杆菌门的比值(c)

25. 替代25%豆油, 50. 替代50%豆油, 75. 替代75%豆油, 100. 替代100%豆油

Fig. 4 Relative abundance of Firmicutes(a), relative abundance of Bacteroidetes(b), ratio of Firmicutes to Bacteroidetes(c)

25. replace 25% soybean oil, 50. replace 50% soybean oil, 75. replace 75% soybean oil, 100. replace 100% soybean oil

组成的真实情况。Shannon和Simpson指数表示样本微生物群落的多样性, Shannon指数值越大, Simpson指数值越小, 说明群落多样性越大;

Ace和Chao代表微生物群落的丰富度, 值越大代表丰度越高^[36]。本研究发现, 随着黑水虻油替代水平的增加, 肠道微生物群落的丰度和多样性显著提高, 且浓度越高效果越明显, 这表明在饲料中添加黑水虻油能改变草鱼肠道菌群的组成。在本研究中, 肠道中厚壁菌门、变形菌门、梭杆菌门和拟杆菌门属于优势菌群。实验观察到用黑水虻油替代豆油提高了草鱼肠道厚壁菌门丰度、降低了拟杆菌门的丰度, 且F/B的比率明显增加, 有研究显示, 肠道厚壁菌门丰度升高、拟杆菌门丰度降低可能影响机体的脂质代谢^[37], 因此推测黑水虻油可能影响了与脂质代谢相关的肠道微生物菌群的组成, 血清中升高的TG水平也支持了上述结果。但草鱼肠道菌群发生改变的机理尚不清楚, 有待进一步研究。

4 结论

研究表明, 黑水虻油可以用于替代草鱼饲料中的大豆油, 不会对生长性能产生不利的影响, 并且增强了草鱼抗氧化能力, 提高了肠道菌群的丰度和多样性, 但在BSO100组中肝脏出现了一定的损伤。综合分析, 在草鱼饲料中黑水虻油替代豆油的比例不宜超过75%。

参考文献:

[1] Kierończyk B, Rawski M, Józefiak A, et al. Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 240: 170-183.

[2] Carvalho R. Carvalho R. A Amazônia rumo ao "ciclo da soja"[J]. *Amazônia Papers*, 1999, 2: 2-7.

[3] Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, et al. *Livestock's long shadow: environmental issues and options*[M]. Rome: Food & Agriculture Org, 2006.

[4] Henry M, Gasco L, Piccolo G, et al. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 203: 1-22.

[5] Makkar H P S, Tran G, Heuzé V, et al. State-of-the-art on use of insects as animal feed[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 197: 1-33.

[6] Lock E R, Arsiwalla T, Waagbø R. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt[J]. *Aquaculture*

- [Nutrition](#), 2016, 22(6): 1202-1213.
- [7] Defoliart G R. Insect fatty acids: similar to those of poultry and fish in their degree of unsaturation, but higher in the polyunsaturates[J]. *The Food Insects Newsletter*, 1991, 4(1): 1-4.
- [8] Finke M D. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth[J]. *Zoo Biology*, 2015, 34(6): 554-564.
- [9] Li S L, Ji H, Zhang B X, *et al.* Influence of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae oil on growth performance, body composition, tissue fatty acid composition and lipid deposition in juvenile jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 43-52.
- [10] Dumas A, France J, Bureau D P. Evidence of three growth stanzas in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across life stages and adaptation of the thermal-unit growth coefficient[J]. *Aquaculture*, 2007, 267(1-4): 139-146.
- [11] 中华人民共和国农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 45.
- [12] Dumas A, Raggi T, Barkhouse J, *et al.* The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 24-34.
- [13] Belghit I, Liland N S, Waagbø R, *et al.* Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 491: 72-81.
- [14] Leong S Y, Kutty S R M, Malakahmad A, *et al.* Feasibility study of biodiesel production using lipids of *Hermetia illucens* larva fed with organic waste[J]. *Waste Management*, 2016, 47: 84-90.
- [15] Sheridan M A. Lipid dynamics in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry*, 1988, 90(4): 679-690.
- [16] NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. Washington, DC: National Academy Press, USA, 2011.
- [17] El-Kamary S S, Shardell M D, Abdel-Hamid M, *et al.* A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(5): 391-400.
- [18] Hyder M A, Hasan M, Mohieldein A H. Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases[J]. *European Journal of Experimental Biology*, 2013, 3(2): 280-284.
- [19] Rahimnejad S, Lee K J. Dietary valine requirement of juvenile reds sea bream *Pagrus major*[J]. *Aquaculture*, 2013, 416-417: 212-218.
- [20] Song Z D, Li H Y, Wang J Y, *et al.* Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*)[J]. *Aquaculture*, 2014, 426-427: 96-104.
- [21] 罗琳, 邢薇, 李铁梁, 等. 亚麻油替代鱼油对杂交鲟生长、脂肪酸组成及脂肪代谢的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 1010-1019.
- Luo L, Xing W, Li T L, *et al.* Growth performance, fatty acid composition, and lipid metabolism in juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt ♀×*A. baeri* Brandt ♂) fed diets of fish oil substituted by various levels of linseed oil[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 1010-1019(in Chinese).
- [22] Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Dick J R, *et al.* Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(1): 49-63.
- [23] Guillou H, Zdravec D, Martin P G P, *et al.* The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice[J]. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49(2): 186-199.
- [24] Li X, Rahimnejad S, Wang L, *et al.* Substituting fish meal with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in diets for bullfrog *Rana (Lithobates) catesbeiana*: effects on growth, digestive enzymes activity, antioxidant capacity and gut health[J]. *Aquaculture*, 2019, 499: 295-305.
- [25] Yuan Y, Wang X X, Jin M, *et al.* Influence of different lipid sources on growth performance, oxidation

- resistance and fatty acid profiles of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. [Aquaculture](#), 2019, 508: 147-158.
- [26] Dutta P, Dey T, Manna P, *et al.* Antioxidant potential of *Vespa affinis* L., a traditional edible insect species of North East India[J]. [PLoS one](#), 2016, 11(5): e0156107.
- [27] Ravi C, Jeyashree A, Devi K R. Antimicrobial peptides from insects: an overview[J]. *Research in Biotechnology*, 2011, 2(5): 1-7.
- [28] Zielińska E, Karaś M, Jakubczyk A. Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects[J]. [International Journal of Food Science Technology](#), 2017, 52(2): 306-312.
- [29] Ostaszewska T, Dabrowski K, Palacios M E, *et al.* Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins[J]. [Aquaculture](#), 2005, 245(1-4): 273-286.
- [30] Bakke-McKellep A M, Penn M H, Salas P M, *et al.* Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. [British Journal of Nutrition](#), 2007, 97(4): 699-713.
- [31] Caballero M J, Izquierdo M S, Kjærsvik E, *et al.* Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources[J]. [Aquaculture](#), 2003, 225(1-4): 325-340.
- [32] Swatson H K, Gous R, Iji P A, *et al.* Effect of dietary protein level, amino acid balance and feeding level on growth, gastrointestinal tract, and mucosal structure of the small intestine in broiler chickens[J]. [Animal Research](#), 2002, 51(6): 501-515.
- [33] Bruslé J, Anadon G G. The structure and function of fish liver[M]//Munshi J S D, Dutta H M. *Fish Morphology*. New York: Science Publishers Inc, 1996.
- [34] Kaushik S J, Medale F, Fauconneau B, *et al.* Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)[J]. [Aquaculture](#), 1989, 79(1-4): 63-74.
- [35] Yamamoto T, Suzuki N, Furuita H, *et al.* Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. [Fisheries Science](#), 2007, 73(1): 123-131.
- [36] 王思宇, 李军, 王秀杰, 等. 添加芽孢杆菌污泥反硝化特性及菌群结构分析[J]. [中国环境科学](#), 2017, 37(12): 4649-4656.
- Wang S Y, Li J, Wang X J, *et al.* Denitrification characteristics of *Bacillus subtilis* sludge and analysis of microbial community structure[J]. [China Environmental Science](#), 2017, 37(12): 4649-4656(in Chinese).
- [37] Meng X L, Li S, Qin C B, *et al.* Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure[J]. [Ecotoxicology and Environmental Safety](#), 2018, 160: 257-264.

Effects of replacing soybean oil with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae oil on the growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

CHEN Yanna¹, LU Ronghua^{1*}, YANG Guokun¹, ZHANG Yuru¹,
QIN Chaobin¹, JI Hong², NIE Guoxing^{1*}

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xixiang 453007, China;

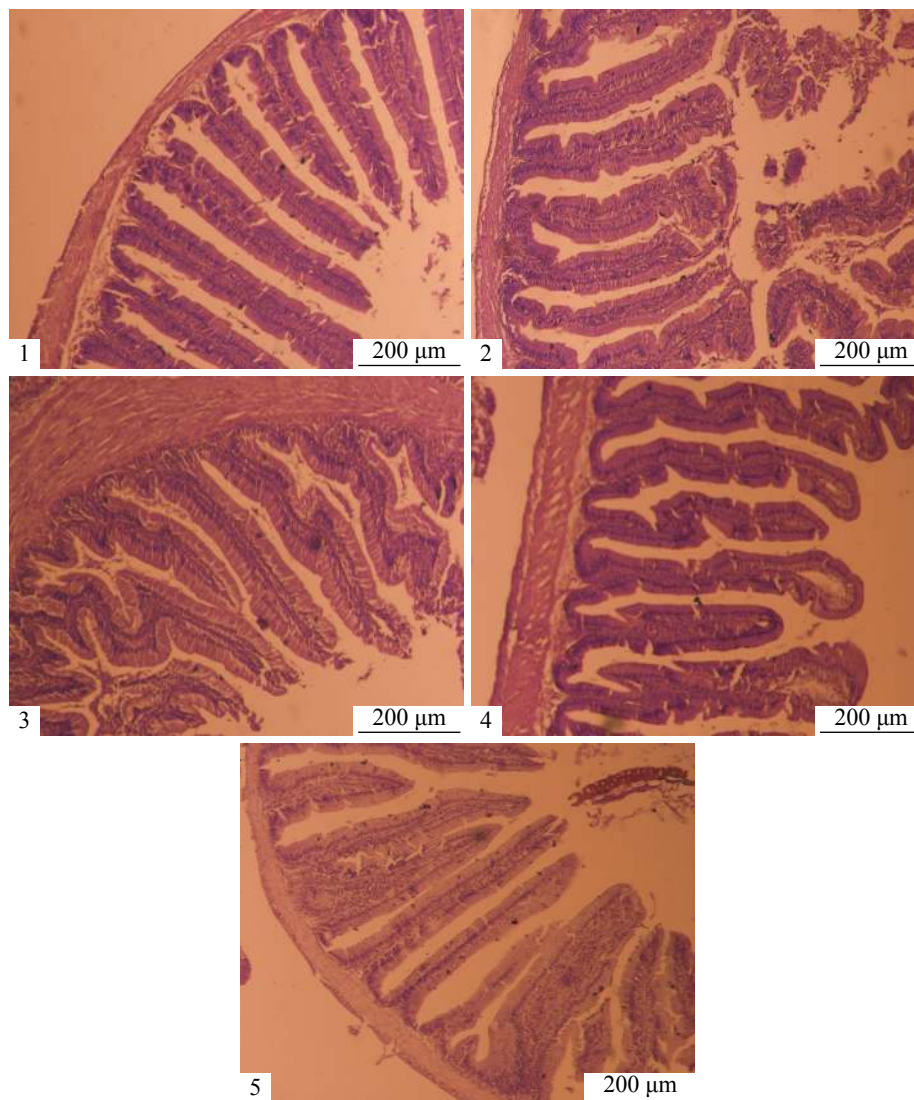
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to study the effects of replacement of soybean oil (SO) with black soldier fly larvae oil (BSO) in grass carp production practice, five isolipidic and isonitrogen experimental diets were formulated by replacing 0% (SO), 25% (BSO25), 50% (BSO50), 75% (BSO75) and 100% (BSO100) of SO with BSO, respectively. After 56 days of feeding, the changes of growth performance, body composition, serum biochemical indexes, antioxidant capacity, intestinal and liver tissue structure, and intestinal microbiota of grass carp were detected. The results showed that there were no significant differences in WGR, FCR, SGR, VSI, CF and HSI among the treatment groups. Compared with the SO group, the activity of serum superoxide dismutase (SOD) in BSO25 and BSO50 groups was significantly higher, malondialdehyde (MDA) activity in BSO75 and BSO100 groups was significantly decreased, and the catalase (CAT) activity was significantly increased in BSO50, BSO75 and BSO100 groups. The morphology of liver cells in BSO100 group was mostly of irregular shape, with unclear boundaries between cells. The enzyme activity of AST, ALT and LDL-C in serum was significantly higher than that of SO group. The community diversity indexes Sobs, Shannon and the richness indexes Chao, Ace in the BSO100 group were significantly higher than those in the SO group. The results showed that 100% soybean oil replaced by BSO did not affect the growth of grass carp, and it could enhance the antioxidant capacity and the abundance and diversity of intestinal microbiota. However, in group BSO100, the liver was damaged, and long-term feeding will have an adverse effect on the body. Therefore, in the feed, BSO should not completely replace soybean oil. It is suggested that the replacement ratio should not exceed 75%.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Hermetia illucens* oil; soybean oil; growth performance; antioxidant ability; intestinal microbiota

Corresponding author: LU Ronghua. E-mail: laoaiyika@hotmail.com; NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn

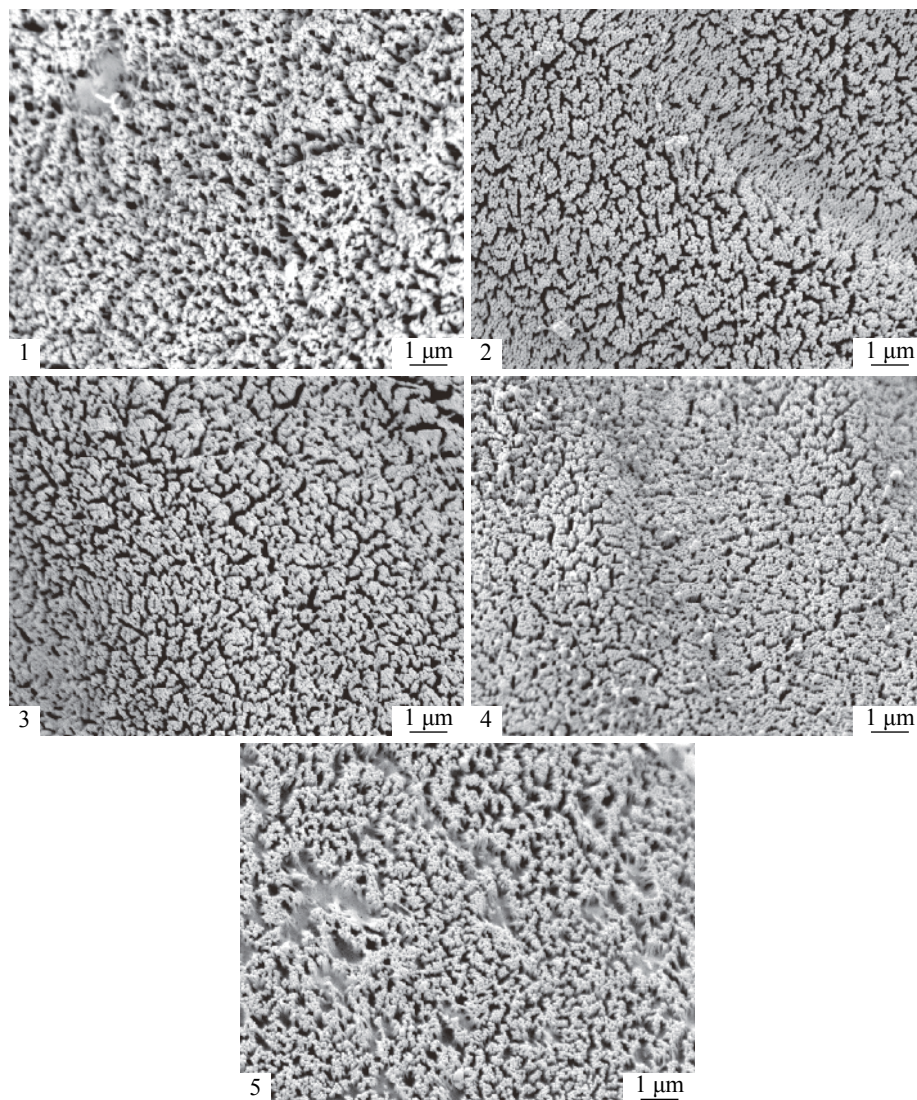
Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402311, 31672671, 31872581); NSFC-United Fund Key Support Project of Henan Province (U1704109); Science and Technology Breakthrough Major Project in Henan Province (182102410031)



图版 I 苏木精-伊红染色的中肠结构

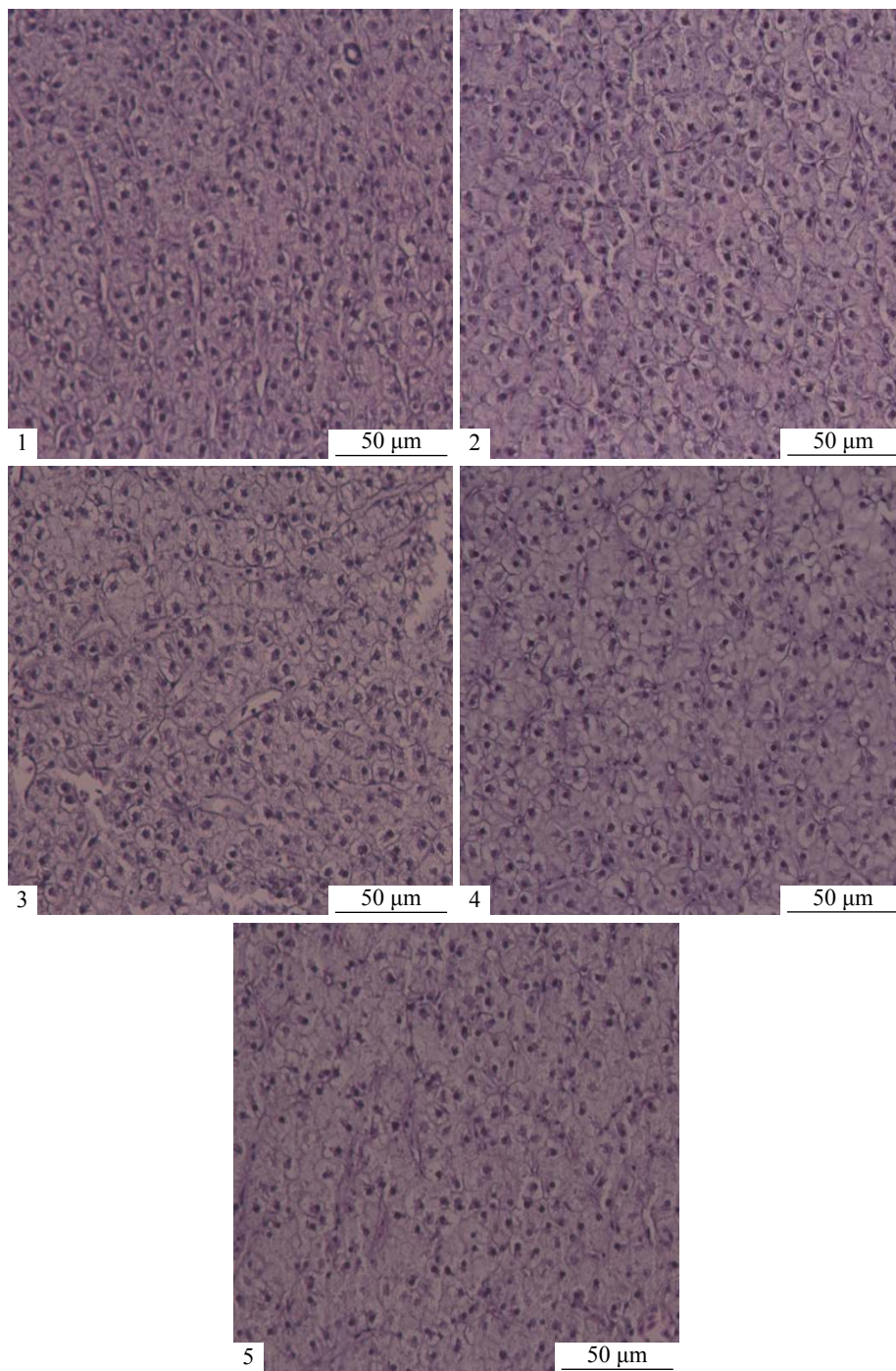
Plate I Midgut structure stained with haematoxylin-eosin stain (×200)

1. SO, 2. BSO25, 3. BSO50, 4. BSO75, 5. BSO100, the same below



图版 II 扫描电镜观察的中肠结构

Plate II Midgut structure observed by scanning electron microscopy ($\times 10\ 000$)



图版 III 肝胰脏组织学形态

Plate III Histological patterns of hepatopancreas($\times 200$)