



新型抗菌物质凹凸棒土对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力和肠道菌群的影响

韩凤禄¹, 陈恩鹏¹, 蒋先程¹, 董晓², 李钊¹,
钱峻哲¹, 徐畅¹, 李二超^{3*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省水产种业工程研究中心,
海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228;

2. 江苏神力特生物科技股份有限公司, 江苏淮安 211700;

3. 华东师范大学生命科学学院, 水生动物营养与水环境健康实验室, 上海 200241)

摘要: 为研究新型抗菌物质凹凸棒土对凡纳滨对虾生长性能、消化能力、抗氧化能力和肠道菌群的影响。实验选取初始体重为 (0.17±0.01) g 的幼虾, 分别投喂质量分数为 0% (对照)、0.1% (S1)、0.2% (S2)、0.4% (S3) 和 0.8% (S4) 的凹凸棒土饲料, 以及含有质量分数为 0.2% 恩诺沙星抗生素对比组饲料 (E), 养殖 8 周。结果显示, 凹凸棒土处理组对虾增重率均未见显著提升, 但 S1、S2 组对虾存活率显著高于对照组, 与 E 组没有显著差异。相比于对照组, 凹凸棒土添加组提高了幼虾肠道淀粉酶活性, 以及肝胰腺中脂肪酶活性。S2 组对虾血清酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性显著高于对照组和 E 组。S3 和 S4 组对虾的肝胰腺超氧化物歧化酶活性显著高于其他组。肠道菌群 α 多样性分析显示, S2 组肠道微生物丰富度 Chao1 指数有所下降, 但是覆盖度显著提高。与对照组相比, S2 组部分属的丰度调节作用与恩诺沙星类似。根据代谢通路差异分析与种间关系作图, 与 E 组相比, 凹凸棒土能够上调牛磺酸、谷胱甘肽、半乳糖和脂肪酸代谢的 4 条通路, 并增加肠道微生物种间合作能力。研究表明, 在饲料中添加 0.1%~0.2% 的凹凸棒土能够显著提高凡纳滨对虾的存活率、消化能力和肝胰腺抗氧化能力, 并在调节对虾肠道部分菌群丰度方面起到类似于恩诺沙星的作用, 能改善肠道菌群结构和相应功能。

关键词: 凡纳滨对虾; 凹凸棒土; 生长; 消化能力; 抗氧化; 肠道菌群

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 是我国乃至世界上养殖范围最广的对虾之一, 其由于营养丰富、饲料转化率高和生长速率快等优良特性, 受到众多养殖户和消费者的青睐^[1]。但随着养殖规模不断扩大, 凡纳滨对虾病害防治问题日益严重, 造成了较大的经济损失^[2]。

早期养殖过程中普遍使用抗生素来有效杀灭病原菌, 但一些抗生素的频繁和不规范使用容易给水产养殖带来不可忽视的消极作用, 如病原对抗生素的耐药性增强使得抗生素药物的药效减弱或消失, 抗生素的过量残留会导致水产品的食品安全问题, 并污染养殖水环境^[3-4]。我国自 2020 年开始

收稿日期: 2022-05-19 修回日期: 2022-10-22

资助项目: 自然科学类横向课题 (HD-KYH-2020091); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B0202010001); 国家自然科学基金 (32060832); 海南大学科研启动基金 [KYQD(ZR)21091]

第一作者: 韩凤禄 (照片), 从事水产动物营养与生理学研究, E-mail: hanfenglu@163.com

通信作者: 李二超, 从事水生动物营养生理与健康调控研究, E-mail: ecl@bio.ecnu.edu.cn



全面禁用饲用抗生素, 因而亟需寻找更安全、污染更小且对细菌性疾病具有相同防控治理能力的物质来替代抗生素。

凹凸棒土主要由凹凸棒石组成, 凹凸棒石具有独特的层链状结构, 表面多孔, 可对多种细菌产生较强的吸附作用, 是矿土中极具代表性的新型抗菌促生长物质^[5-6]。通过调控表面的亲疏水性、电荷和活性基团, 可加强其对多种霉菌毒素的定向吸附性能^[7-8]。此外, 在饲料中添加凹凸棒土能在一定程度上增加饲料硬度, 提升饲料在水中的稳定性, 并间接提高养殖动物的摄食率, 从而降低饲养过程中的饲料浪费。通过饲料营养调控动物健康生理功能的可行性已被大量相关研究证实。在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 饲料中添加适宜的凹凸棒土, 能够提高其内脏的抗氧化能力和铁含量, 降低组织铅和铬的积累, 促进中华绒螯蟹健康生长^[9]。鸡饲料中添加凹凸棒土可以增加肉鸡空肠分泌性免疫球蛋白含量, 使超氧化物歧化酶活性呈线性增加, 对肉鸡肠道免疫、氧化状态、完整性和屏障功能表现出有利的影响^[10]。

动物的肠道微生物平衡为个体免疫调节和生长发育提供了有效的保证, 凹凸棒土对动物的肠道微生物群落结构、多样性以及丰度也具有一定的影响, 对维持肠道微生态平衡起到积极作用。研究发现, 在饲料中适量添加载锌凹凸棒土能够降低仔猪肠道中有害菌含量, 增加有益菌菌群数量, 维持肠道微生态平衡, 效果与高剂量抗生素相似^[11]。在饲料中添加凹凸棒土可显著增加犊牛肠道总菌数量以及双歧杆菌和芽孢杆菌的数量, 并显著降低犊牛肠道大肠杆菌数量, 有效改善了肠道菌群结构^[12]。还有研究表明, 在饲料中添加含锌凹凸棒土能够降低团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肠道食糜中大肠杆菌和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的数量, 改善鱼类肠道菌群结构和分布^[13]。然而, 作为一种新型抗菌物质, 凹凸棒土对甲壳动物肠道菌群结构的影响相关研究较少。本研究通过在基础饲料中添加不同含量的凹凸棒土, 探究其对凡纳滨对虾生长性能、消化能力、抗氧化能力和肠道菌群的影响, 并确定其适宜添加量, 对今后凡纳滨对虾的无抗化养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

本实验饲料配方为在基础饲料上分别添加质

量分数为 0 (对照)、0.1% (S1)、0.2% (S2)、0.4% (S3) 和 0.8% (S4) 的凹凸棒土。同时为了对比替代抗生素的实际效果, 本实验增设 1 组抗生素添加组, 选择凡纳滨对虾养殖过程中常用的抗生素 (恩诺沙星), 添加剂量为 0.2% (质量分数), 并记为 E 组 (表 1)。饲料原料研磨后经过 60 目网筛, 原料逐级混合后, 混入双蒸水及油源, 混匀过筛后, 经双螺旋压条机及制粒机制成颗粒均匀的饲料, 经室温风干后分组标记, 随后置于 -20 °C 冰箱储存备用。

1.2 养殖管理

凡纳滨对虾苗购于海南省文昌市蓝色海洋虾苗场, 在实验室内暂养 2 周后, 选取初始体重为 (0.17±0.01) g 的健康幼虾, 随机分配至 24 个玻璃水族箱 (60.0 cm × 30.0 cm × 36.0 cm) 中, 每个实验处理组 4 个平行, 每个平行 20 尾虾, 分别投喂其所对应的饲料, 养殖实验在海南大学珊瑚馆进行。各玻璃水族箱分上下层均匀排布, 安装遮光帘避免光线直射, 以减少因光线等环境因素不同而造成的误差。投喂方式为饱食投喂, 每日分别于 8:00、16:00 和 22:00 时投喂, 初始投喂量为对虾体重的 4%, 后续根据当日摄食情况调整次日投喂量, 每天换水 50%。养殖期间, 水温 24.5~30.0 °C, 溶解氧含量大于 6.0 mg/L, 总氨氮小于 0.03 mg/L, pH 7.5~8.0, 养殖 8 周。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

1.3 样品的采集与处理

养殖 8 周, 禁食 24 h 后取样。记录存活的凡纳滨对虾数量, 测量并记录每尾虾的体长和体重, 用于计算存活率与增重率。用一次性注射器 (1 mL) 从对虾围心腔内抽取血淋巴, 4 °C 过夜后离心, 取上清液置于 1.5 mL 离心管中。每个平行随机抽取 6 尾虾, 分别取肝胰腺、肠道组织和肌肉样品, 置于冻存管中, 采集后立即保存在液氮中。各样品处理结束后快速转移至 -80 °C 冰箱, 用于后续分析。

1.4 计算公式

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = (终末体重 - 初始体重) / 初始体重 × 100%

存活率 (survival rate, SR, %) = 终末数量 / 初始数量 × 100%

表 1 凡纳滨对虾 4 种实验饲料的配方
Tab. 1 Ingredients of the four experimental diets fed to *L. vannamei* g/kg

原料 ingredient	实验处理组 experimental treatments					
	对照 control	S1	S2	S3	S4	E
鱼粉 fish meal	25	250	250	250	250	250
豆粕 soybean meal	300	300	300	300	300	300
玉米淀粉 corn starch	250	250	250	250	250	250
凹凸棒土 attapulgate ¹⁾	0	1	2	4	8	0
恩诺沙星 enrofloxacin	0	0	0	0	0	2
鱼油 fish oil	10	10	10	10	10	10
豆油 soybean oil	20	20	20	20	20	20
大豆卵磷脂 soy lecithin	1	10	10	10	10	10
胆固醇 cholesterol	5	5	5	5	5	5
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	10	10	10	10	10	10
复合维生素 vitamin premix ²⁾	20	20	20	20	20	20
复合矿物质 mineral premix ³⁾	20	20	20	20	20	20
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethyl cellulose	30	30	30	30	30	30
氯化胆碱 choline chloride	5	5	5	5	5	5
抗氧化剂 antioxidant	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
甜菜碱 betaine	10	10	10	10	10	10
纤维素 cellulose	59.5	58.5	57.5	55.5	51.5	57.5
合计 total	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
饲料成分含量/% feed ingredient content						
水分 moisture	8.51	8.38	8.36	8.99	7.42	7.47
粗蛋白 crude protein	32.18	32.63	32.79	31.96	31.93	31.85
粗脂肪 crude lipid	7.25	7.81	7.96	7.48	7.66	7.75
灰分 ash	9.26	9.42	9.79	9.38	9.17	9.69

注: 1).凹凸棒土由江苏神力特生物科技股份有限公司提供, 2)和3).复合维生素、复合矿物质分别由杭州民生生物科技股份有限公司提供。

Notes: 1). palygorskite is offered by Jiangsu Shenlit Biotechnology Co., Ltd., 2) and 3). vitamin premix and mineral premix are offered by Hangzhou Minsheng Biotechnology Co., Ltd..

1.5 实验饲料和实验虾营养成分测定

饲料和肌肉组成分析参考 AOAC(2000) 的标准方法, 水分测定采用 105 °C 烘干至恒重 (24 h), 灰分测定采用 550 °C 马弗炉灼烧法 (PCD-E3000, Serials, Peaks, Japan), 粗蛋白和粗脂肪测定分别采用杜马斯燃烧法和索氏抽提法 (FOSS, Soxtec™ 2055, 瑞士)。

1.6 对虾肠道消化酶活性的测定

将肝胰腺和肠道样品降温后, 取 0.1 g 组织, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 置于离心机, 3 500 r/min, 4 °C 离心 15 min 后, 取上清液检测胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶。

1.7 血清非特异性免疫的测定

检测酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 和溶菌酶 (LZM)。使用南京建成生物工程研究所的生化检测试剂盒进行检测, 操作过程按照试剂盒说明进行。

1.8 肝胰腺抗氧化能力的测定

检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.9 肠道微生物分析

对虾肠道组织取样结束后, 将组织样品按照试剂盒说明提取肠道微生物总 DNA, 并测定其浓度。以细菌 16S 核糖体 rRNA 基因测序 V3~V4 高

可变区为目标设计引物, 得到正向引物 338F (5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCA-3') 和反向引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 反应体系为 25 μ L (反应参数: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min)。PCR 产物纯化后委托上海派森诺生物医药科技有限公司进行双末端测序, 并从该公司获取原始数据, 对数据进行分析处理, 聚类分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs)。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似性水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 参考 Sliva 数据库对照样品 OTUs 进行物种注释。最后使用 Mothur 软件进行 Alpha 多样性分析, 计算 Chao1、Shannon、Good-Coverage 和 Simpson 指数, 并计算肠道菌群中在属水平上相对丰度排名前 100 的菌种间的相互作用, 进行可视化处理。

1.10 数据分析

本实验所有的数据分析使用 SPSS Statistics 23 (IBM, 美国) 软件, 用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。对照组和其他处理组的差异分析使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 影响显著时再进行 Duncan 氏多重比较、莱文方差 (Levene) 等同性检验, 之后使用独立样本 *t* 检验分别分析 E 组和其他各组之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

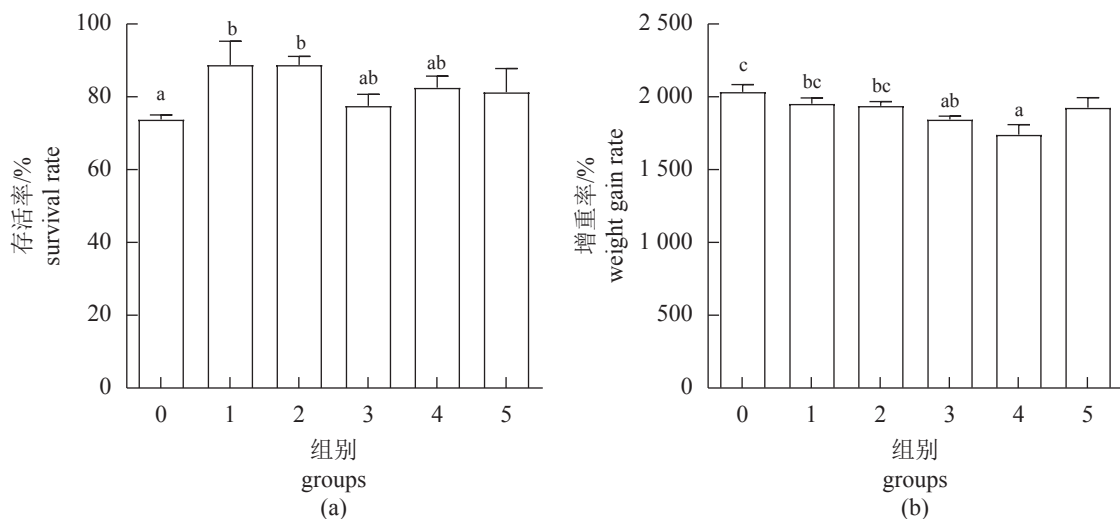


图 1 不同处理对凡纳滨对虾存活率 (a) 和增重率 (b) 的影响

0. 对照组, 1. S1 组, 2. S2 组, 3. S3 组, 4. S4 组, 5. E 组 (添加恩诺沙星组)。不同字母表示两组值之间具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of different treatments on the survival rate (a) and weight gain rate (b) of *L. vannamei*

0. control, 1. S1, 2. S2, 3. S3, 4. S4, 5. E (enrofloxacin group). Different letters represent significant differences between the two sets of values ($P < 0.05$), the same below.

2 结果

2.1 凹凸棒土对凡纳滨对虾生长性能的影响

凹凸棒土添加组的幼虾存活率均高于对照组, 其中 S1 和 S2 组显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1-a), 但是与 E 组没有显著差异。此外, S1 和 S2 组幼虾增重率与对照组、E 组均无显著差异, 但是 S3 和 S4 组增重率显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 1-b)。

2.2 凹凸棒土对凡纳滨对虾体成分的影响

各处理组对虾的肌肉水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量均无显著差异, 表明在饲料中添加凹凸棒土对凡纳滨对虾的肌肉营养成分没有影响 (表 2)。

2.3 凹凸棒土对凡纳滨对虾肝胰腺和肠道消化酶活性的影响

本实验检测了不同处理对凡纳滨对虾肝胰腺和肠道消化酶活性的影响。肝胰腺中, 不同处理组淀粉酶活性无显著差异 (图 2-a)。S3 组和 E 组 LPS 活性显著高于对照组 (图 2-b) ($P < 0.05$)。S4 组蛋白酶活性显著低于对照组 (图 2-c) ($P < 0.05$)。肠道中, S1、S2 和 S4 组淀粉酶活性显著高于对照组 (图 2-d) ($P < 0.05$), S3 组与对照组无显著差异。S1 组 LPS 活性显著高于对照组 (图 2-e) ($P < 0.05$)。蛋白酶活性随着凹凸棒土含量升高呈先升高后降低的变化, 其中 S2 组显著高于对照组 (图 2-f) ($P < 0.05$)。

表 2 实验各组凡纳滨对虾肌肉成分组成分析 (干重)
Tab. 2 Inter-group analysis of muscle composition of *L. vannamei* (dry weight) %

肌肉成分 muscle composition	实验处理组 experimental treatment group					
	对照 control	S1	S2	S3	S4	E
水分 moisture	78.10±0.27	78.05±0.09	78.16±0.46	78.08±0.09	78.63±0.35	78.47±0.35
粗蛋白 crude protein	84.18±0.16	83.93±0.49	85.09±0.40	85.11±0.46	85.17±0.42	85.54±0.29
粗脂肪 crude lipid	9.88±0.40	11.41±0.91	9.32±0.64	9.59±0.74	10.58±0.84	9.38±0.67
灰分 ash	8.96±0.23	9.27±0.34	8.93±0.36	9.41±0.15	8.99±0.46	9.06±0.26

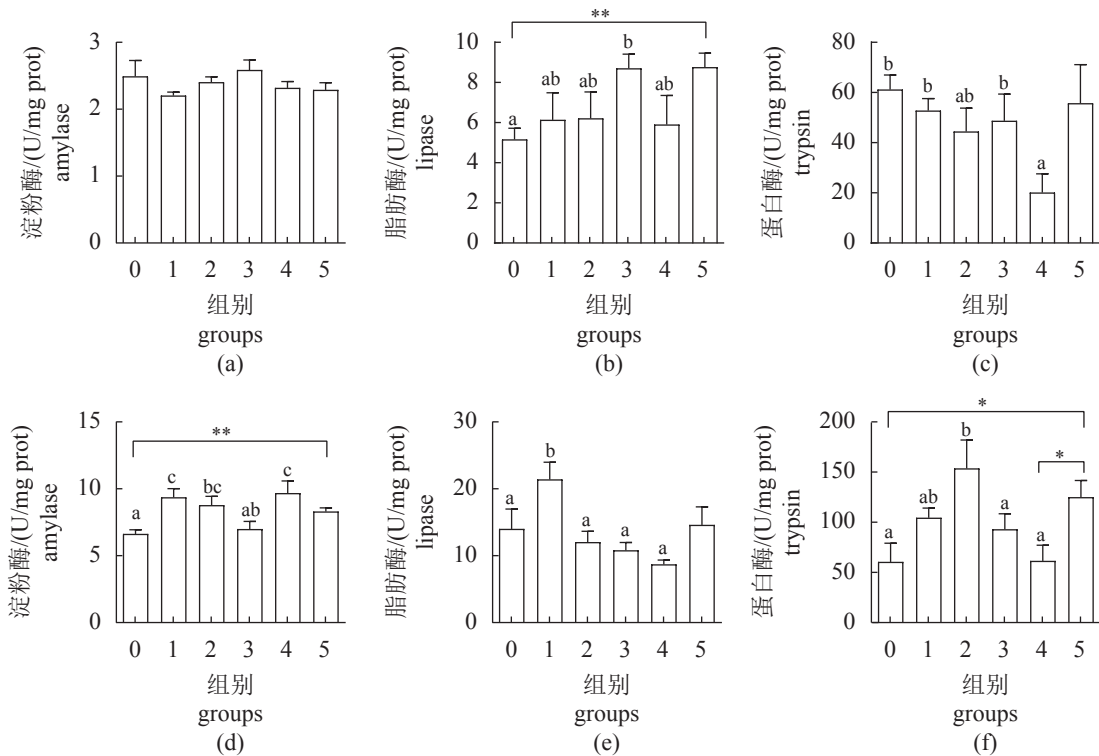


图 2 不同处理对凡纳滨对虾消化酶活性的影响

(a)~(c) 肝胰腺, (d)~(f) 肠道。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), 下同。

Fig. 2 Effects of different treatments on the activity of digestive enzymes of *L. vannamei*

(a)~(c) hepatopancreas, (d)~(f) intestine. * indicates a significant difference ($P < 0.05$), ** indicates an extremely significant difference ($P < 0.01$), the same below.

2.4 凹凸棒土对凡纳滨对虾血清非特异性免疫的影响

血清 ACP 和 AKP 活性都是在 S2 组达到最高, 其中, S2 组 AKP 活性显著高于对照组和 S1 组 (图 3-a, b) ($P < 0.05$)。LZM 活性随着凹凸棒土含量的升高有降低的趋势, 其中, S1 和 S2 组与对照组差异不显著 (图 3-c) ($P > 0.05$)。

2.5 凹凸棒土对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化能力的影响

肝胰腺中, S4 组 MDA 含量显著高于对照组

和 E 组 ($P < 0.05$), 其余组与对照组之间无显著差异 (图 4-a) ($P > 0.05$)。对照组 GSH-Px 活性显著高于其他组 (图 4-b) ($P < 0.05$)。S3 组与 E 组 SOD 活性显著高于其他组 (图 4-c) ($P < 0.05$)。各实验组的 CAT 活性无显著差异。

2.6 凹凸棒土对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

本实验选择生长表现较好的 S2 组分别与对照组和 E 组进行肠道菌群对比分析。S2 组肠道 Chao1、Simpson 和 Shannon 菌群多样性指标显著低于对照组, 但表征覆盖度指数 Goods-Cover-

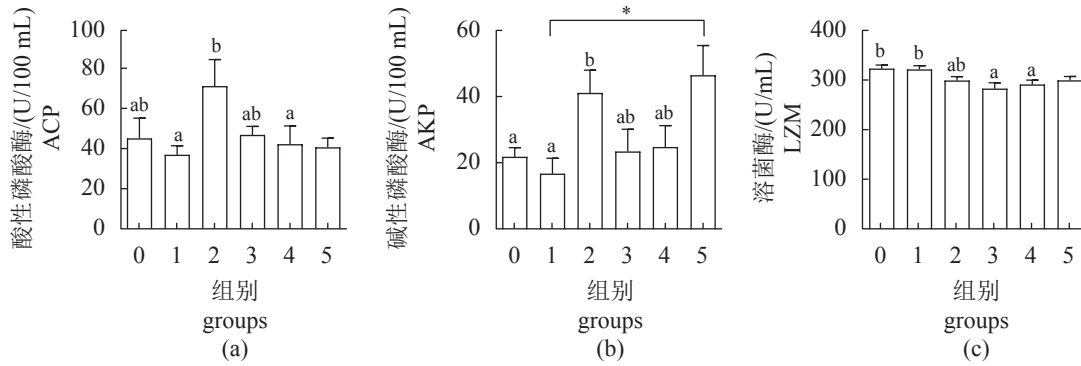


图 3 不同处理对凡纳滨对虾血清非特异性免疫的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on serum nonspecific immunity of *L. vannamei*

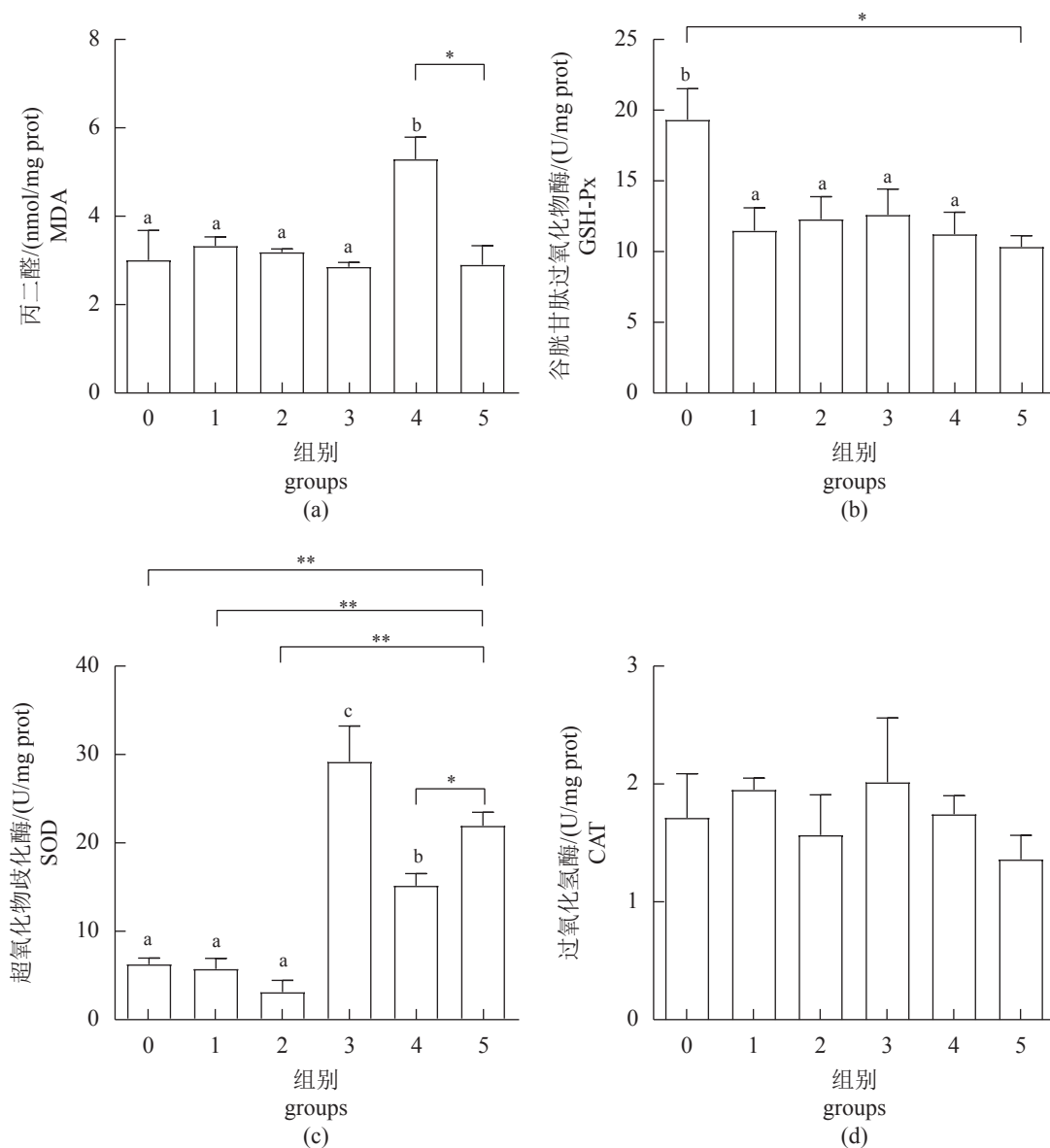


图 4 不同处理对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化能力的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on the antioxidant capacity of the hepatopancreas of *L. vannamei*

age 却呈相反的变化, 显著高于对照组 (图 5)。

主成分分析发现, S2 组的菌群组成显著区别于对照组, 而 E 组菌群组成介于对照组和 S2 组之间 (图 6-a)。菌群相对丰度方面, 门水平下, S2 组拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度极显著高于对照组 (图 6-b) ($P<0.01$); S2 组厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度极显著低于对照组 (图 6-b) ($P<0.01$);

疣微菌门 (Verrucomicrobia) 的相对丰度极显著低于 E 组 (图 6-b) ($P<0.01$); 变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度极显著高于另外两组 (图 6-b) ($P<0.01$)。属水平下, S2 组罗斯氏菌属 (*Roseburia*) 相对丰度极显著高于另外两组 (图 6-c) ($P<0.01$); 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 相对丰度极显著高于对照组 (图 6-c) ($P<0.01$), 显著高于 E 组 (图 6-c) ($P<0.05$);

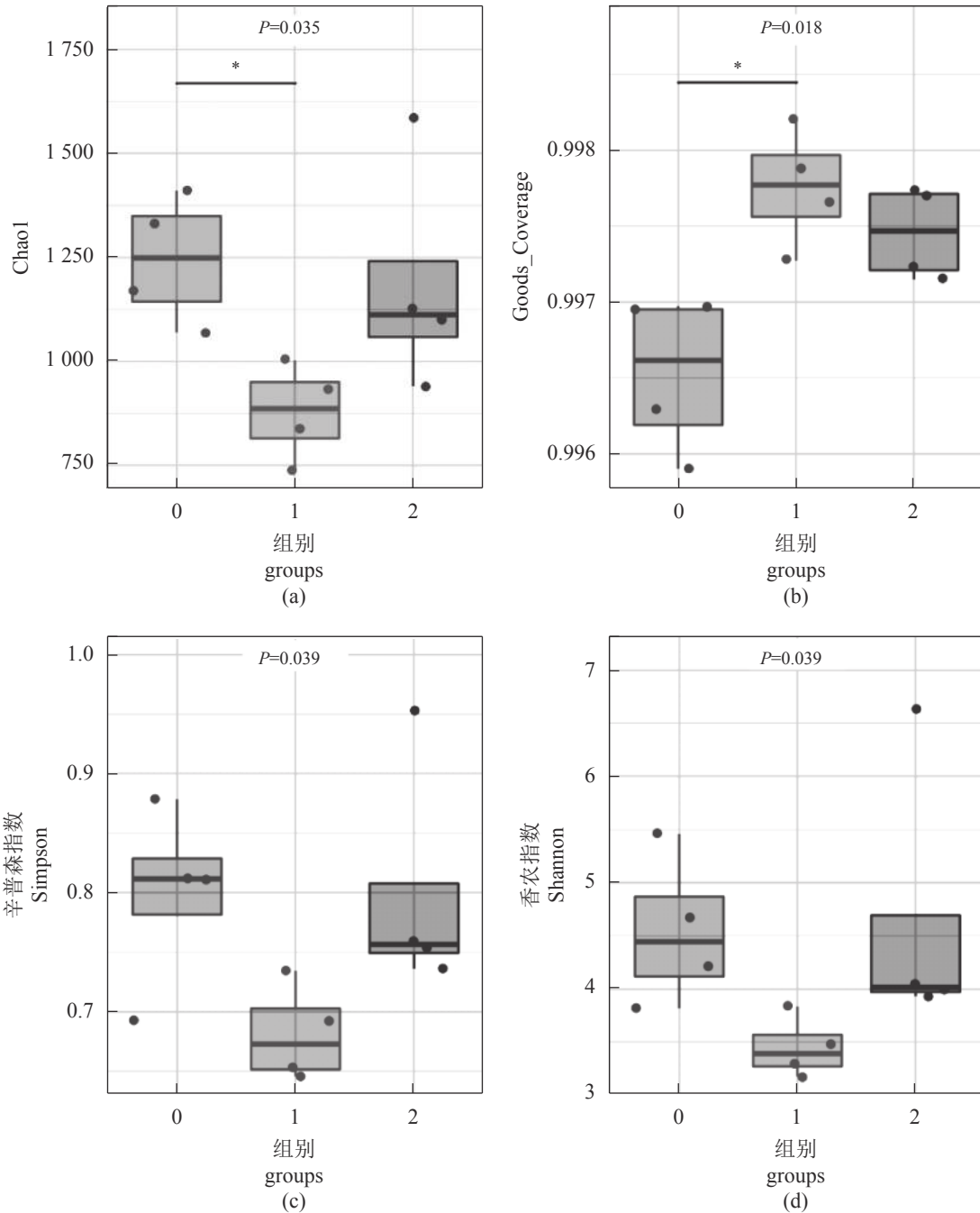


图 5 不同处理对凡纳滨对虾肠道微生物多样性的影响

0. 对照组, 1. S2 组, 2. E 组。

Fig. 5 Effects of different treatments on intestinal microbial diversity of *L. vannamei*

0. control group, 1. S2 group, 2. E group.

假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 和十八杆菌属 (*Octadecabacter*) 相对丰度显著低于另外两组 (图 6-c) ($P<0.05$); S2 组的黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 的相对丰度极显著低于对照组 (图 6-c) ($P<0.01$); 弧菌属 (*Vibrio*) 的相对丰度显著低于对照组, 但显著高于 E 组 (图 6-c) ($P<0.05$)。

根据不同组的肠道菌群组成进行代谢通路差异分析, 共有 5 条 KEGG 途径发生了显著变化。与对照组相比, S2 组牛磺酸和亚牛磺酸代谢、谷胱甘肽代谢、半乳糖代谢和脂肪酸代谢通路显著上调 (图 7) ($P<0.05$)。与 E 组相比, S2 组酪氨酸酶与新霉素的生物合成通路极显著上调 (图 7) ($P<0.01$)。

为了评估不同处理对肠道菌群间相互作用的影响, 建立了对照组、S2 组和 E 组在属水平上相对丰度排名前 100 的菌种, 并制作网络图。其中 S2 组种间关系互作网络图由 94 个节点和 275 条边组成, 节点数与其他两组接近, 边数在对照组和 E 组之间 (表 3)。共线图显示, S2 组与 E 组比对照组网络线更为密集, 且正向线更多 (图 8), 代表着有更高程度的肠道微生物种间合作能力。

3 讨论

凹凸棒土可以改善畜禽动物的肠道健康, 提高其生长性能, 已经被应用于畜禽养殖行业。有

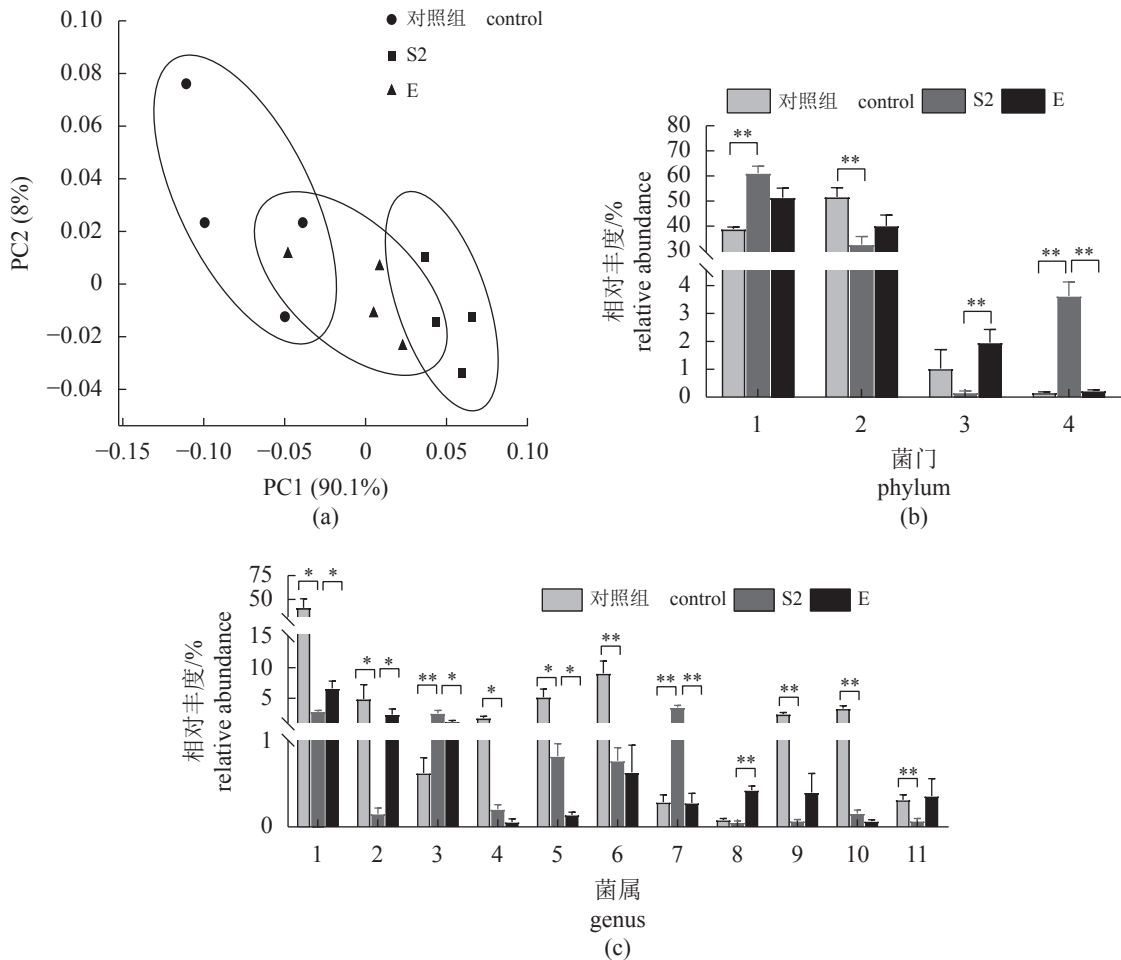


图 6 不同处理对凡纳滨对虾肠道微生物相对丰度的影响

(a) 肠道菌群主成分分析; (b) 肠道微生物门水平差异, 1. 拟杆菌门, 2. 厚壁菌门, 3. 疣微菌门, 4. 变形菌门; (c) 肠道微生物属水平差异, 1. 十八杆菌属, 2. 假交替单胞菌属, 3. 乳杆菌属, 4. 食酸菌属, 5. 弧菌属, 6. 微杆菌属, 7. 罗斯氏菌属, 8. 副球菌属, 9. 肠球菌属, 10. 拟杆菌属, 11. 黄杆菌属。

Fig. 6 Effects of different treatments on the relative abundance of intestinal microbial of *L. vannamei*

(a) main component analysis of intestinal flora; (b) differences at the phylum level of intestinal microorganisms, 1. Bacteroidetes, 2. Firmicutes, 3. Verrucomicrobia, 4. Proteobacteria; (c) differences at the genus level of intestinal microorganisms, 1. *Octadecabacter*, 2. *Pseudoalteromonas*, 3. *Lactobacillus*, 4. *Acidovorax*, 5. *Vibrio*, 6. *Microbacterium*, 7. *Roseburia*, 8. *Paracoccus*, 9. *Enterococcus*, 10. *Bacteroides*, 11. *Flavobacterium*.

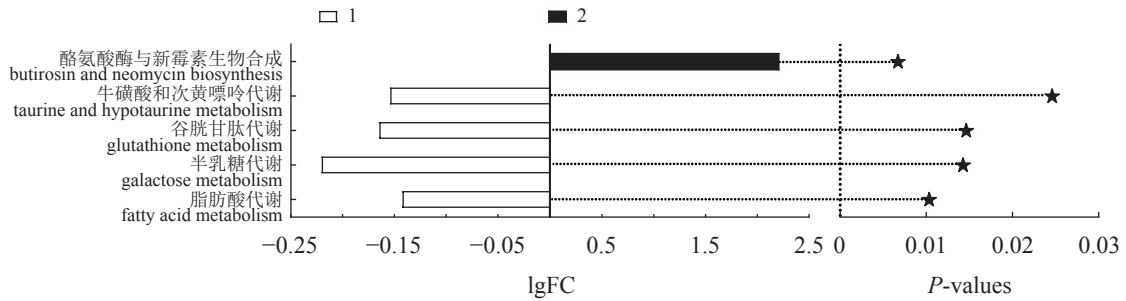


图 7 不同处理对凡纳滨对虾肠道微生物预测功能的丰度比

图例 1 表示对照与 S2 组相比功能变化的信号通路；图例 2 表示 S2 与 E 组相比功能变化的信号通路。右侧对应的星号表示预测功能丰度比的 P 值，P<0.05 表示差异显著，P<0.01 表示差异极显著。FC 指通路表达差异倍数。

Fig. 7 Abundance ratio of different treatments for the prediction function of intestinal microbes in *L. vannamei*

1 represent the signal pathway of the control group compared with the S2 group for functional changes; 2 represent the signal pathway of S2 group compared to E group. The corresponding asterisk on the right indicates the P value of the predicted functional abundance ratio, P<0.05 indicates a significant difference, and P<0.01 indicates that the difference is significant. FC indicates fold change of pathway expression.

表 3 不同处理凡纳滨对虾肠道微生物共生网络的拓扑特性

Tab. 3 Topological characteristics of intestinal microbial symbiotic networks for different treatment groups of *L. vannamei*

拓扑结构 topology	实验处理组 experimental treatment group		
	对照 control	S2	E
节点/个 node	95	94	94
边/条 edge	250	273	305
门/个 phylum	11	12	13

研究表明，在肉鸡饲料中添加不同水平的改性凹凸棒土能够有效改善肉鸡的生长性能^[10]。给断奶仔猪投喂添加 0.2% 凹凸棒土的日粮，可以帮助机体提高对营养物质的利用率、降低腹泻指数，从而改善其生长性能^[14]。在甲壳类养殖动物的研究中，添加凹凸棒土对其生长情况无显著影响，在饲料中添加凹凸棒土对凡纳滨对虾摄食量、饲料系数和吸收效率的影响不显著^[15]。添加凹凸棒土并未显著提高克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的生长情况与生长性能，少量或过量凹凸棒土甚至会减缓其生长，导致增重率和特定生长率显著降低^[16]，这与本研究结果一致。其原因可能在于不同动物肠道微生物组成区系存在差异，在多因素协同作用下，凹凸棒土对不同动物的生长性能的影响也不同。本实验生长结果显示，添加凹凸棒土能够显著提高凡纳滨对虾的存活率，原因可能是通过改善肠道菌群结构、提高幼虾的免疫水平从而提高存活率^[17-18]，但适量添加凹凸棒土时，幼虾增重率无显著变化，添加水平超过 0.2% 时，

会显著抑制幼虾的增重率。

凡纳滨对虾摄食后，肠道中营养成分的吸收主要取决于消化酶的水平，水产动物的消化能力和生长发育都与消化酶活性有着紧密的联系^[19-20]。此外，肝胰腺也能够分泌多种消化酶，将食物消化、吸收，并存储营养，与凡纳滨对虾的生长及免疫密切相关^[21]。有研究表明，添加凹凸棒土能刺激蛋鸡分泌消化酶，提高消化酶活性，改善肠道结构形态，促进肠道健康并达到提高机体生长的目的^[22]。为了探究凹凸棒土影响动物生长作用的原因，本实验检测了凡纳滨对虾肝胰腺和肠道消化酶的活性。结果显示，在肝胰腺中，添加 0.4% 的凹凸棒土显著提高了脂肪酶活性，而淀粉酶和胰蛋白酶活性无显著差异，高水平的凹凸棒土 (0.8%) 甚至会抑制胰蛋白酶活性。在肠道中，凹凸棒土的添加能够提高淀粉酶活性，而脂肪酶和胰蛋白酶活性分别在 0.1% 和 0.2% 水平显著提高。因此，综合分析肝胰腺和肠道消化酶结果，凹凸棒土影响凡纳滨对虾消化能力主要作用的靶组织为肠道。凹凸棒土对不同动物消化能力有不同程度的影响，在本实验中凹凸棒土的促消化作用并未促进生长，可能是由于投饲策略、使用量等因素导致。

非特异性免疫是甲壳动物免疫系统应对病菌的主要抵抗方式^[23]。凡纳滨对虾作为甲壳动物，免疫系统较为简单，不具有获得性免疫系统，主要依赖于非特异性免疫来增强对疾病的抗性^[24]。ACP、AKP 和 LZM 等的活性通常被用来评价对虾抗病能力^[25-26]。当血清中的 LZM 活性提高时，机体的免疫能力也会相应提升。本研究评价了凡

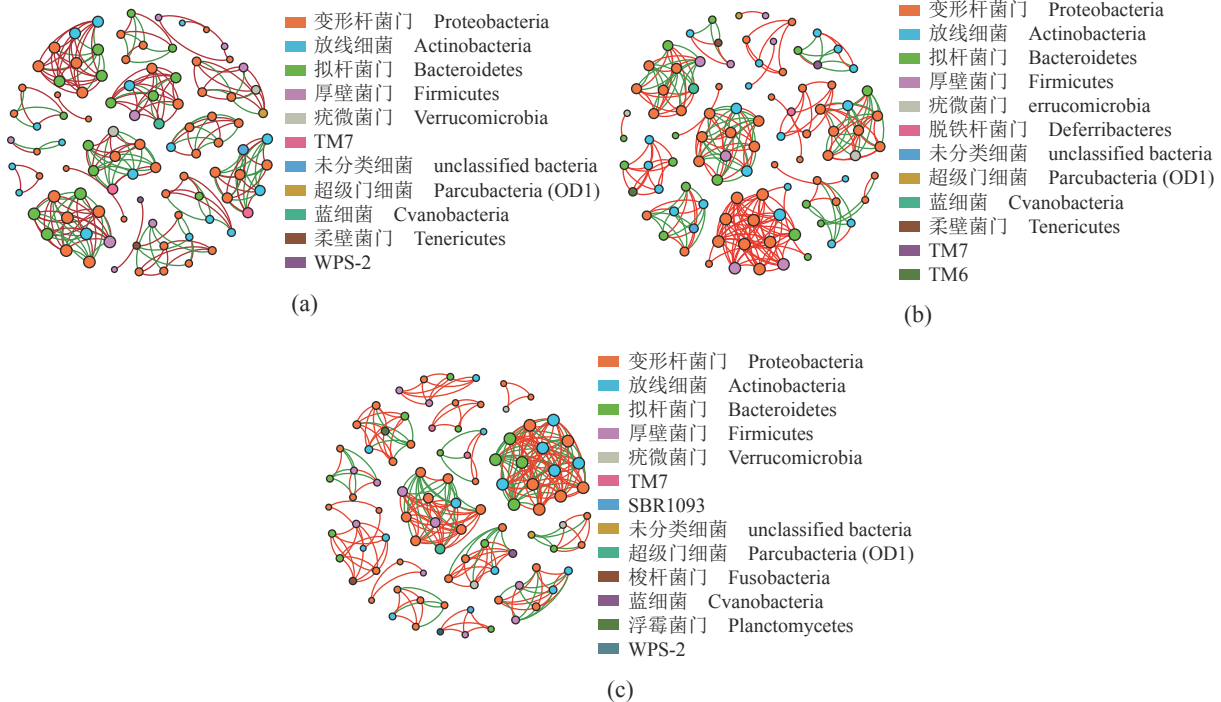


图 8 不同处理凡纳滨对虾肠道微生物的种间关系网络图

(a) 对照组, (b) S2 组, (c) E 组。每个节点代表一个细菌属, 节点颜色表示细菌属于的门。两个单独节点之间, 红线表示正交互作用, 绿线表示负交互作用。

Fig. 8 Interspecific network diagram of different treatments of intestinal microorganisms of *L. vannamei*

(a) control, (b) S2 group, (c) E group. Each node represents a genus of bacteria. The node color indicates the phylum to which the bacteria belong. Between two separate nodes, the red line represents a positive interaction, and the green line represents a negative interaction.

纳滨对虾的血清非特异性免疫, 结果显示, 0.2% 凹凸棒土添加组的血清 ACP 和 AKP 活性显著提高。AKP 与 ACP 直接参与磷酸的转移和代谢, 协同溶菌酶起到防御外源病原体侵袭的作用^[27]。此外, AKP 在对虾的钙质吸收、骨骼形成和甲壳素的形成及分泌过程中还具有重要作用, 通过提高 AKP 活性可以提高钙的沉积和吸收速率^[28-29]。ACP 是溶酶体的标志酶, 其活性可以代表溶酶体吞噬和包裹反应的强度^[30]。LZM 作为一种非特异性免疫酶, 本实验结果显示, 添加高于 0.2% 的凹凸棒土会降低对虾血清 LZM 活性。以上结果显示, 在饲料中添加 0.2% 的凹凸棒土能够有效提高凡纳滨对虾的非特异性免疫能力。

肝胰腺作为甲壳动物脂肪沉积的主要组织, 容易被机体产生的氧自由基攻击而发生氧化损伤, SOD 作为机体超氧阴离子的消除剂, 能够将超氧阴离子自由基歧化, 生成氧与过氧化氢, 在机体氧化损伤和抗氧化平衡中起关键的调控作用^[31]。饲料中添加 0.4% 凹凸棒土能够显著激活 SOD 活性, 有效保护凡纳滨对虾肝胰腺细胞免受氧自由基损伤。然而, 0.8% 凹凸棒土处理组出现幼虾肝

胰腺 SOD 活性显著上升, 作为氧化应激终产物的 MDA 含量也显著增加, 生长表现情况较差, 表明过量添加凹凸棒土反而会引起肝胰腺过氧化损伤, 伴随着 SOD 活性代偿性升高的现象^[32]。因此, 饲料中添加过量的凹凸棒土不利于对虾肝胰腺抵御氧化应激。

肠道菌群影响宿主的营养吸收、免疫反应和肠黏膜形态, 通过直接接触代谢物而与肠黏膜相连, 形成复杂的微生物系统^[33-34]。水生动物与陆生动物不同, 其体表长期且直接暴露于含有大量微生物的水体, 故水生动物也更易因肠道菌群失衡而患病^[35-36]。本研究结果显示, 0.2% 凹凸棒土添加组对虾肠道微生物丰富度 Chao1 指数有所下降, 但覆盖度显著提高, 推测可能与凹凸棒土具有某些微生物的特异性吸附有关。基于各组 OUT 丰度水平的主成分分析结果显示, S2 组与对照组位置完全分开, 而 E 组介于对照组和 S2 组之间, 表明 S2 组的对虾肠道菌群结构与对照组之间差异显著, 而与 E 组较为接近。

本实验的对照、S2 和 E 组的对虾肠道菌群中, 偏最小二乘法判别 (PLS-DA) 分析显示, 相对丰度

差异最显著的前 4 种分别为拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门和厚壁菌门。其中厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌门能降解难消化的多糖并发酵膳食纤维, 产生短链脂肪酸, 从而提高肠道屏障完整性^[37-38]。与对照组相比, S2 组拟杆菌门相对丰度显著提高, 而变形菌门丰度显著降低, 但与 E 组无显著差异。关于对虾肠道菌群研究表明, 变形菌和拟杆菌均为对虾肠道内的主要菌群, 在体内发挥着重要作用^[39-40]。其中拟杆菌门可将复杂的碳水化合物降解成短链脂肪酸, 为动物提供能量^[41]。变形菌门中包含的细菌种类繁多, 包括霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 等较多常见的致病菌, 变形菌门丰度的降低有助于调节肠道微生态平衡^[42]。S2 组对虾肠道疣微菌门的相对丰度显著低于 E 组, 而厚壁菌门相对丰度显著高于另外两组, 其原因可能在于凹凸棒土对疣微菌门细菌具有特殊的吸附性, 厚壁菌门具有较高的相对丰度, 更利于对虾对肠道内多糖物质的有效利用^[43]。另外, 属水平上的相关性分析表明, 凹凸棒土处理对部分属的丰度调节作用与恩诺沙星类似, 如十八杆菌属、食酸菌属、微杆菌属、肠球菌属和弧菌属。凹凸棒土对水产常见病原菌如肠球菌属和弧菌属的抑制作用比较明显, 尽管与恩诺沙星的作用效果还存在一定差异, 尤其是弧菌属, 但凹凸棒土可显著提高对虾肠道中罗斯氏菌属和乳杆菌属的相对丰度。罗斯氏菌能够利用多糖产生丁酸。乳杆菌是水产饲料中常用的益生菌, 对提高水生动物肠道的消化能力和抑制病原菌的繁殖具有重要作用^[44]。综上所述, 饲料添加凹凸棒土有利于凡纳滨对虾塑造更健康的肠道菌群, 提高凡纳滨对虾对营养物质的消化吸收以及增强对病原菌的抵抗能力。

在本研究中, S2 组的牛磺酸和亚牛磺酸代谢、谷胱甘肽代谢、半乳糖代谢和脂肪酸代谢通路显著上调, 这表明凹凸棒土可通过调节对虾肠道菌群模式, 促进对相关营养物质的代谢与利用。其中, 牛磺酸常被当作水生动物生长所必需的促生长因子, 具有营养、生理、生化和药理作用, 可影响水生动物的代谢、生长和基因表达等^[45], 而谷胱甘肽作为非酶抗氧化物质, 可抵御机体受到氧化应激的风险, 通过调节与生长代谢相关的酶以及抗氧化酶的活性, 降低 MDA 含量来保护细胞膜通透性, 清除自由基, 维持细胞膜正常的生

理功能和完整性^[46]。与恩诺沙星抗生素组相比, 添加凹凸棒土上调了对虾肠道酪氨酸酶与新霉素生物合成通路, 表明添加凹凸棒土可提升对虾利用肠道微生物合成抗生素的能力。在对虾肠道微生物的种间关系方面, 正相互作用代表微生物的种间合作关系, 而负相互作用则代表竞争或捕食关系^[47], S2 组的肠道菌群多样性有一定程度的降低, 但肠道微生物种间合作能力不低于对照组, 甚至有所提升, 表明了饲料中添加凹凸棒土可用于凡纳滨对虾无抗化健康养殖。

4 结论

在凡纳滨对虾饲料中适量添加凹凸棒土, 机体通过非特异性免疫提高了幼虾的存活率。消化酶活性具有一定程度的提高, 但增重率无显著变化, 并未起到促生长作用。肠道菌群研究结果显示, 凹凸棒土在调节对虾肠道部分菌群丰度方面发挥着类似恩诺沙星的作用, 调节对虾肠道微生态平衡, 并通过调节肠道菌群模式, 提高幼虾对营养物质的吸收利用能力和免疫保护能力。基于上述研究结果, 建议凡纳滨对虾幼虾饲料中凹凸棒土适宜添加量为 0.1%~0.2%。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Landsman A, St-Pierre B, Rosales-Leija M, et al. Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(4): 93.
- [2] Lafferty K D, Harvell C D, Conrad J M, et al. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 471-496.
- [3] 徐晓津, 李秀华, 马一帆, 等. 复方中草药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼溶藻弧菌病的治疗效果[J]. *水产学报*, 2019, 43(5): 1338-1346.
Xu X J, Li X H, Ma Y F, et al. Effects of traditional Chinese compound prescription and antibiotics treating in *Vibrio alginolyticus* diseases of *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1338-1346 (in Chinese).
- [4] Ling Z H, Yang Y, Huang Y L, et al. A preliminary

- investigation on the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the Beijiang River, South China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(8): 1656-1661.
- [5] Kubota M, Nakabayashi T, Matsumoto Y, *et al.* Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 64(1): 88-97.
- [6] Zhao W Q, Liu X, Huang Q Y, *et al.* Interactions of pathogens *Escherichia coli* and *Streptococcus suis* with clay minerals[J]. *Applied Clay Science*, 2012, 69: 37-42.
- [7] Masimango N, Remacle J, Ramaut J L. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B₁ from contaminated media[J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1978, 6(1): 101-105.
- [8] Hassen A, Jamoussi F, Saidi N, *et al.* Microbial and copper adsorption by smectitic clay-an experimental study[J]. *Environmental Technology*, 2003, 24(9): 1117-1127.
- [9] Zhang R Q, Du M F, Wen C, *et al.* Evaluation of palygorskite on pellet quality, growth, antioxidant status and mineral contents of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(4): 1446-1454.
- [10] Su Y, Chen Y P, Chen L J, *et al.* Effects of different levels of modified palygorskite supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status and intestinal integrity and barrier function of broilers[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2018, 102(6): 1574-1584.
- [11] 孙文恺, 刘强, 刘洋, 等. 载锌凹凸棒石对断奶仔猪肠道免疫功能、食糜挥发性脂肪酸及粪便菌群的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52(1): 43-49.
- Sun W K, Liu Q, Liu Y, *et al.* Effects of zinc-bearing palygorskite on the intestinal immune function, volatile fatty acid of digesta and fecal microbiota of weaned piglets[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 52(1): 43-49 (in Chinese).
- [12] 王栋, 杜垣逸, 郑铎, 等. 饲料中添加凹凸棒土对荷斯坦犊牛生长性能、腹泻率、血清生化指标和肠道菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(12): 6843-6852.
- Wang D, Du Y Y, Zheng D, *et al.* Effects of palygorskite supplementation on growth performance, diarrhea incidence, serum biochemical indexes and intestinal microflora of Holstein calves[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(12): 6843-6852 (in Chinese).
- [13] Zhang R Q, Wen C, Chen Y P, *et al.* Zinc-bearing palygorskite improves the intestinal development, antioxidant capability, cytokines expressions, and microflora in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 16: 100269.
- [14] Lv Y F, Tang C H, Wang X Q, *et al.* Effects of dietary supplementation with palygorskite on nutrient utilization in weaned piglets[J]. *Livestock Science*, 2015, 174: 82-86.
- [15] 王兴强, 曹梅, 阎斌伦, 等. 饲料中添加凹凸棒土对凡纳滨对虾存活和生长的影响[J]. *水生生态学杂志*, 2008, 1(1): 149-152.
- Wang X Q, Cao M, Yan B L, *et al.* The effects of attapulgit as a diet supplement on survival and growth of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2008, 1(1): 149-152 (in Chinese).
- [16] 董静, 王利国, 窦勇, 等. 凹凸棒石黏土对饲料溶失率及克氏原螯虾生长性能、肌肉中Pb沉积的影响[J]. *饲料研究*, 2019, 42(1): 21-24.
- Dong J, Wang L G, Dou Y, *et al.* Effect of attapulgit supplementation on leaching loss ratio, growth performance and Pb accumulation in muscle of *Procambarus clarkii*[J]. *Feed Research*, 2019, 42(1): 21-24 (in Chinese).
- [17] 袁勇, 文伟, 冯智茂, 等. 凹凸棒石的作用机制及其在动物生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(6): 2533-2542.
- Yuan Y, Wen W, Feng Z M, *et al.* Mechanism of attapulgit and its application in animal production[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(6): 2533-2542 (in Chinese).
- [18] Tseng D Y, Ho P L, Huang S Y, *et al.* Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 339-344.
- [19] 石英, 冷向军, 李小勤, 等. 饲料蛋白水平对血鸚鵡幼鱼生长、体组成和肠道蛋白消化酶活性的影响[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 874-880.
- Shi Y, Leng X J, Li X Q, *et al.* Effect of dietary protein levels on growth performance, whole body composition and intestinal digestive enzyme activities of *Cichlasoma*

- sp. juvenile[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 874-880 (in Chinese).
- [20] 李会峰, 李二超, 徐畅, 等. 饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾生长、免疫、胰腺腺组织结构及肠道菌群的影响[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 98-114.
Li H F, Li E C, Xu C, *et al.* Effects of silymarin on growth, activities of immune-related enzymes, hepatopancreas histology and intestinal microbiota of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 98-114 (in Chinese).
- [21] Lai C Y, Cheng W, Kuo C M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(5): 417-430.
- [22] Qiao L H, Chen Y P, Wen C, *et al.* Effects of natural and heat modified palygorskite supplementation on the laying performance, egg quality, intestinal morphology, digestive enzyme activity and pancreatic enzyme mRNA expression of laying hens[J]. *Applied Clay Science*, 2015, 104: 303-308.
- [23] Lee S Y, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 421-437.
- [24] Cornick J W, Stewart J E. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1973, 21(3): 255-262.
- [25] 陈晓瑛, 曹俊明, 黄燕华, 等. 饲料中添加低聚木糖对凡纳滨对虾幼虾生长性能、非特异性免疫力、抗氧化功能及对抗对虾白斑综合征病毒能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(8): 2397-2407.
Chen X Y, Cao J M, Huang Y H, *et al.* Xylo-oligosaccharides supplementation affects growth performance, non-specific immunity, antioxidant function and anti-white spot syndrome virus capacity of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2397-2407 (in Chinese).
- [26] Rojtinnakorn J, Hirano I, Itami T, *et al.* Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 13(1): 69-83.
- [27] Han F L, Qi C L, Li Z D, *et al.* Improvement of dietary N-acetylcysteine on growth inhibition and intestinal damage induced by β -conglycinin in juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 514: 734504.
- [28] 刘存岐, 王安利, 王维娜, 等. 海水中几种金属离子对中国对虾幼体体内碱性磷酸酶和ATPase的影响[J]. *水产学报*, 2001, 25(4): 298-303.
Liu C Q, Wang A L, Wang W N, *et al.* Influences of metal ions in seawater on activities of alkaline phosphatase (AKP) and ATPase in mysis and postlarvae of *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(4): 298-303 (in Chinese).
- [29] Latif M A, Brown J H, Wickins J F. Effects of environmental alkalinity on calcium-stimulated dephosphorylating enzyme activity in the gills of postmoult and intermoult giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1994, 107(4): 597-601.
- [30] Elnesr S S, Ropy A, Abdel-Razik A H. Effect of dietary sodium butyrate supplementation on growth, blood biochemistry, haematology and histomorphometry of intestine and immune organs of Japanese quail[J]. *Animal*, 2019, 13(6): 1234-1244.
- [31] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1-2): 111-123.
- [32] Pandey S, Parvez S, Sayeed I, *et al.* Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.) [J]. *Science of the Total Environment*, 2003, 309(1-3): 105-115.
- [33] Sha Y J, Liu M, Wang B J, *et al.* Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(10): 1736-1745.
- [34] Gilbert J A, Blaser M J, Caporaso J G, *et al.* Current understanding of the human microbiome[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(4): 392-400.
- [35] Adams A. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1991, 1(1): 59-70.
- [36] Pinoargote G, Flores G, Cooper K, *et al.* Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic nec-

- rosis disease[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(10): 3270-3288.
- [37] Zhang Y J, Li S, Gan R Y, *et al.* Impacts of gut bacteria on human health and diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 7493-7519.
- [38] Gholizadeh P, Mahallei M, Pormohammad A, *et al.* Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 48-55.
- [39] Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, *et al.* Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91853.
- [40] 汤上上, 韩凤禄, 周利, 等. 甘露寡糖对低盐胁迫下凡纳滨对虾生长、健康及肠道菌群的影响[J]. *水产学报*, 2021, 45(12): 2044-2060.
- Tang S S, Han F L, Zhou L, *et al.* Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth, health and intestinal microbiota of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinity[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(12): 2044-2060 (in Chinese).
- [41] Becker A A, Hesta M, Hollants J, *et al.* Phylogenetic analysis of faecal microbiota from captive cheetahs reveals under representation of Bacteroidetes and *Bifidobacteriaceae*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 43.
- [42] Shin N R, Whon T W, Bae J W. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [43] Ransom-Jones E, McCarthy A J, Haldenby S, *et al.* Lignocellulose-degrading microbial communities in landfill sites represent a repository of unexplored biomass-degrading diversity[J]. *mSphere*, 2017, 2(4): e00300-17.
- [44] Desai A R, Links M G, Collins S A, *et al.* Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 350-353: 134-142.
- [45] 许友卿, 刘晓丽, 郑一民, 等. 牛磺酸对水生物主要营养代谢和基因表达的影响及机理[J]. *饲料工业*, 2020, 41(16): 35-40.
- Xu Y Q, Liu X L, Zheng Y M, *et al.* Effect and mechanism of taurine on the metabolism of aquatic animal[J]. *Feed Industry*, 2020, 41(16): 35-40 (in Chinese).
- [46] 高金伟, 吴浩, 李绍明, 等. 氨氮和镉胁迫对芙蓉鲤鲫抗氧化系统和免疫机能的影响[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(4): 448-456.
- Gao J W, Wu H, Li S M, *et al.* Ammonia nitrogen and cadmium stress on antioxidant system and immune function of furong crucian carp (*Cyprinus capio furong. ♀* × *Carassius auratus red var. ♂*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(4): 448-456 (in Chinese).
- [47] Deng Y, Jiang Y H, Yang Y F, *et al.* Molecular ecological network analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113.

Effects of new antibacterial substance palygorskite on the growth, antioxidant capacity and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*

HAN Fenglu¹, CHEN Enpeng¹, JIANG Xiancheng¹, DONG Xiao², LI Zhao¹,
QIAN Junzhe¹, XU Chang¹, LI Erchao^{3*}

(1. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology of Hainan Province,
Hainan Aquaculture Breeding Engineering Research Center,

College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Jiangsu Sinitic Biological Technology Co., Ltd., Huaian 211700, China;

3. Laboratory of Aquaculture Nutrition and Environment Health, School of Life Sciences,
East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: The aim of this study is to study the effects of palygorskite, a new antibacterial substance, on the growth performance, digestibility, antioxidant capacity and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. The juvenile shrimp with an initial weight of (0.17±0.01) g were selected and fed with diets with 0% (control), 0.1% (S1), 0.2% (S2), 0.4% (S3), and 0.8% (S4) palygorskite, respectively, as well as the antibiotic control group diet (E) containing 0.2% enrofloxacin and were cultured for 8 weeks. The weight gain of shrimp in the palygorskite treatment groups did not increase significantly, but the survival rate of shrimp in the S1 and S2 groups was significantly higher than that in the control group, and there was no significant difference from the E group. Compared with the control group, the palygorskite supplementation groups showed increases in the activities of intestinal amylase, lipase and trypsin, as well as the lipase activity in the hepatopancreas of juvenile shrimp. The serum acid phosphatase and alkaline phosphatase activities in the S2 group were significantly higher than those in the control and E groups. The hepatopancreas superoxide dismutase activity of the S3 or S4 groups was significantly higher than that of the other groups. The α diversity analysis of intestinal microbiota showed that the Chao1 index of intestinal microbial richness decreased in the S2 group, but the coverage increased significantly. Compared with the control group, the abundance regulation of some genera in the S2 group was similar to that of enrofloxacin compared with the E group. According to the difference analysis of metabolic pathways and the mapping of interspecific relationships, palygorskite can upregulate 4 pathways of taurine, glutathione, galactose and fatty acid metabolism and increase the cooperation ability among intestinal microbes. Adding 0.1%-0.2% palygorskite to the diet can significantly improve the survival rate, digestibility and hepatopancreas antioxidant capacity of *L. vannamei* and play a role similar to that of enrofloxacin in regulating the abundance of intestinal microbiota in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; palygorskite; growth; digestibility; antioxidants; intestinal microbiota

Corresponding author: LI Erchao. E-mail: ecli@bio.ecnu.edu.cn

Funding projects: Crosswise Subjects of Natural Science (HD-KYH-2020091); Research and Development Program Project in Key Areas of Guangdong Province (2020B0202010001); National Natural Science Foundation of China (32060832); Initial Fund from the Hainan University for R & D [KYQD(ZR)21091]