



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

姚海行^{1,2}, 陈效儒³, 袁汉文¹, 罗凯¹, 方刘¹,
陈焱¹, 郜卫华^{1*}, 田娟^{2*}, 刘永胜⁴

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

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

3. 通威股份有限公司, 水产健康养殖四川省重点实验室, 四川 成都 610041;

4. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探究克氏原螯虾配合饲料经发酵处理后的饲喂效果, 分别用未发酵和发酵饲料在室内循环水系统中饲养体重为 (4.91±0.18) g 的克氏原螯虾幼虾 8 周, 采样分析发酵饲料对克氏原螯虾生长、肌肉品质、消化力、抗氧化能力及肠道菌群结构的影响。结果显示, ①发酵饲料水中溶失率显著低于未发酵饲料; ②发酵饲料显著提高克氏原螯虾增重率和特定生长率, 降低饲料系数, 但对存活率、肝体比、含肉率和体成分无显著影响; ③发酵饲料显著提高克氏原螯虾肌肉硬度、弹性、咀嚼性和胶黏性, 降低了黏附性; ④发酵饲料显著提高克氏原螯虾肝胰腺及肠道中胰蛋白酶和脂肪酶活性, 血清和肝胰腺中超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性, 以及肝胰腺总抗氧化能力; ⑤发酵饲料显著提高了肠道绒毛长度和宽度; ⑥发酵饲料改善了克氏原螯虾肠道微生物结构, 显著升高了厚壁菌门和放线菌门相对丰度, 同时提高了肠道菌群多样性。研究表明, 饲料经发酵处理后可以有效提高克氏原螯虾生长性能、肌肉品质、消化力和抗氧化能力, 改善了肠道组织结构, 改变了肠道微生物结构, 为克氏原螯虾新型环保饲料的生产提供理论依据。

关键词: 克氏原螯虾; 发酵饲料; 生长性能; 肌肉品质; 抗氧化能力; 肠道菌群

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

发酵技术用于食品加工和保存已有数千年的历史^[1]。发酵饲料是以饲料原料或者配合饲料为基础, 在人工控制条件下(含水量一般控制在 70% 以下), 利用天然或人工添加的益生菌进行发酵, 通过益生菌的代谢活动生产富含益生菌及其

代谢产物的新型饲料总称^[2]。广泛应用于发酵饲料的益生菌有乳杆菌 (*Lactobacillus*)^[3]、芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[4]、酵母菌 (*Saccharomyces*)^[5]、曲霉菌 (*Aspergillus*)^[6-7] 等。发酵饲料已广泛应用于饲养畜禽动物, 相较于传统饲料, 发酵饲料能够有效提

收稿日期: 2022-04-24 修回日期: 2022-08-26

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2022XT01); 四川省重点研发项目 (2018NZ0152); 通威股份有限公司产学研合作项目 (TW20181001, 2011259); 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题 (KFT202003, KFT202102); 湖北省教育厅百校联百县项目 (BXLBX0312, BXLBX0306)

第一作者: 姚海行 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: yaohaihanga@163.com; 陈效儒, 从事特种水产动物营养与饲料学研究, E-mail: CHENXR@tongwei.com

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



高饲料适口性、降低抗营养因子 (ANFs)、改善动物肠道形态并维持肠道菌群平衡、提高营养物质吸收和消化率, 从而提高养殖对象生长性能、肌肉品质和免疫能力^[8-10]。发酵饲料在水产动物中的研究相对滞后, 主要集中在发酵型植物蛋白原料^[11-12]以及发酵原料替代鱼粉^[13-15]等对水产动物生长性能和饲料利用率等的影响。在甲壳动物包括凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[2,13-14]和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[5,16]中的研究发现, 使用不同菌株和发酵工艺均可提高甲壳动物生长性能、消化力、免疫力以及改变肠道微生物群落结构。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 俗称小龙虾, 隶属十足目 (Decapoda) 螯虾科 (Cambaridae)^[17]。2020年, 我国克氏原螯虾养殖总面积达到 1 456.42 千 hm^2 , 养殖总产量达到 239.37 万 t, 位列我国淡水养殖品种第 6 位, 同比 2019 年分别增长 13.25% 和 14.55%^[18]。然而, 克氏原螯虾面临着高效养殖技术缺乏、提质增效空间受限、苗种繁育能力滞后、品质退化等^[19]诸多问题, 且“五月瘟”等细菌性、病毒性疾病流行也给克氏原螯虾养殖业带来了巨大的经济损失^[20]。因此, 本实验以克氏原螯虾为研究对象, 旨在评估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的影响, 为发酵饲料在克氏原螯虾实际生产与应用上提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

对照组饲料 (control feed, CON) 为烟台大乐饲料有限公司生产的克氏原螯虾全价配合饲料。发酵饲料 (fermented feed, FF) 采用固态发酵法, 按照酵母菌: 植物乳杆菌: 芽孢杆菌 = 1:1:1 (单位体积活菌数) 接种益生菌, 37°C 恒温发酵房内发酵 15~24 h, 发酵为软颗粒饲料。发酵饲料的无氮浸出物含量降低 $\geq 10\%$, 小肽含量 $\geq 18\%$; 将发酵饲料放入活菌专用密封袋包装, 在常温、避光处可保存 6 个月。主要营养指标及水解氨基酸含量见表 1。

1.2 养殖管理

实验虾苗购自荆州市高清水产专业合作社, 暂养在长江大学水产基地的半室内循环水系统, 开始暂养前用聚维酮碘对养殖桶进行消毒。实验

表 1 实验饲料营养成分及水解氨基酸含量 (干重)

Tab. 1 Nutritional composition and hydrolyzed amino acid content of experimental feed (dry matter) %

项目 items	组别 groups	
	CON	FF
基本营养成分 nutrients composition		
水分 moisture	10.10±0.01 ^a	28.42±0.01 ^b
粗蛋白质 crude protein	35.49±0.93	35.06±1.24
粗脂肪 crude lipid	9.31±0.75	9.49±0.14
灰分 ash	14.31±0.11	14.86±0.12
水解氨基酸 hydrolyzed amino acids		
必需氨基酸 essential amino acid		
精氨酸 Arg	2.13	2.15
组氨酸 His	0.62	0.63
异亮氨酸 Ile	0.96	1.05
亮氨酸 Leu	1.90	2.01
赖氨酸 Lys	1.40	1.45
蛋氨酸 Met	0.46	0.47
苯丙氨酸 Phe	1.26	1.33
苏氨酸 Thr	1.26	1.64
缬氨酸 Val	1.22	1.32
非必需氨基酸 non-essential amino acid		
丙氨酸 Ala	1.60	1.68
天冬氨酸 Asp	2.69	2.88
胱氨酸 Cys	0.35	0.37
甘氨酸 Gly	1.94	1.93
谷氨酸 Glu	5.65	5.98
脯氨酸 Pro	1.72	1.78
丝氨酸 Ser	1.32	1.30
酪氨酸 Tyr	0.89	0.95
氨基酸总量 ΣAA	27.35	28.89
必需氨基酸总量 ΣEAA	11.20	12.04
非必需氨基酸总量 ΣNEAA	16.15	16.85

注: CON. 对照组, FF. 发酵组; 同一行不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$); 下同。

Notes: CON. control group, FF. fermentation group; different letters in the same line indicate significant differences ($P < 0.05$); the same below.

采用半室内循环水系统, 设置对照组和发酵组, 选择 6 个底面积为 1.8 m^2 的塑料桶, 每个塑料桶放 20 尾克氏原螯虾, 每组 3 个重复。24 h 饥饿处理后, 挑选个体平均体重 (4.91±0.18) g 的幼虾随机分配到 6 个塑料桶中开展实验, 实验共进行 8 周。每个养殖桶中放入 20 根 (直径 9 cm, 长 20 cm) PVC 水管以及适量塑料仿生水草以供虾苗攀爬和躲避, 水体 pH 值控制为 7.0±0.5, 溶解氧不

低于 5.0 mg/L, 氨氮控制在 0.1 mg/L 以下。每 2 天换水 1/2, 每天进行清污, 并记录当天的水温和气温。实验期间每天饱食投喂 2 次, 投喂时间分别为 8:00 和 17:00。本研究获得了长江大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守《中国实验动物管理条例》伦理规范, 并按照长江大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 样品采集与分析

养殖实验结束后, 将克氏原螯虾禁食 24 h。将所有虾捞出, 吸干体表水分, 称重并统计每个实验桶存活数量。每桶随机取 10 尾虾, 测定体重和肝胰腺重, 用于生长指标的分析。用一次性无菌注射器将血液从围心腔抽出, 储存在 1.5 mL 的离心管中, 离心 (4 °C、14 400 × g, 30 min) 取上清液, 于 -80 °C 保存血清。取肠道组织固定在 4% 多聚甲醛中, 用于制备肠道苏木精-伊红 (H. E) 染色切片。称取肌肉, 于 -20 °C 冰箱保存, 用于计算含肉率及测定水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量。每桶随机挑取 4 尾虾, 用 75% 乙醇擦拭虾体进行消毒, 再用无菌生理盐水冲洗 2~3 次, 在无菌操作条件下取出肠道及内容物, 将 4 尾虾的肠道组织混合样本冻于干冰中, 用于分析肠道微生物菌群。每桶随机挑取 2 尾鲜虾, 用于肌肉质构分析。其余实验虾于冰上迅速取出肝胰腺和肠道组织, 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.4 分析方法

饲料水中稳定性测定 准确称取各组饲料 10 g, 放入尼龙过滤网袋 (高 30 cm, 宽 20 cm 呈长方形, 孔径 0.25 mm), 将网袋置于恒温水浴锅中, 水温在 25~28 °C, 浸泡一定时间后取出网袋, 将网袋内饲料置于 105 °C 烘箱烘干至恒重 (W , g), 另测定未浸泡的饲料水分含量 (X , %)。每组饲料设 3 个重复, 水中稳定性用溶失率 C 表示。

$$C(\%) = [G(1-X) - W] / G(1-X) \times 100\%$$

式中, C 为溶失率 (%); X 为试样含水率 (%); G 为试样质量 (g); W 为烘干后网袋内试样质量 (g)。

生长性能测定 计算公式

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

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

$$\text{特定生长率 (specific growth rate, SGR, \% / d)} =$$

$$(\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{饲料系数 (feed conversion ratio, FCR)} = W_f / (W_t N_t - W_0 N_0 + W_d)$$

$$\text{肝体比 (hepatosomatic index, HSI, \%)} = W_h / W_t \times 100\%$$

含肉率 (flesh content, FC, %) = $W_m / W_t \times 100\%$
式中, W_t 为终末体重 (g); W_0 为初始体重 (g); N_t 为终末尾数; N_0 为初始尾数; t 为实验天数 (d); W_f 为饲料摄入量 (g); W_d 为死亡总重 (g); W_h 为肝胰腺重 (g); W_m 为虾尾部肌肉重 (g)。

基本营养成分分析 饲料中的水分含量采用 105 °C 直接干燥法 (GB/T 5009.3—2010); 肌肉水分采用冷冻干燥法 (SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机) 测定; 粗蛋白采用凯氏定氮法 (GB/T 5009.5—2016); 粗脂肪采用索氏抽提法 (GB/T 5009.6—2016); 灰分采用灼烧称重法 (GB/T 5009.4—2016)。

肠道组织切片测定 肠道组织标本固定后, 经脱水、透明、石蜡包埋、连续切片后, H. E 染色, 使用 DM2500 (Leica, 德国) 对染色切片进行观察及拍照, 运用图像分析系统 (Image Pro Plus 6.0) 对 H. E 染色结果进行分析。

肠道消化酶活性测定 准确称取新鲜肝胰腺和肠道组织 (约 0.8 g), 放入 10 mL 匀浆管中, 加入 9 倍体积的去离子水, 用玻璃匀浆器进行冰浴匀浆, 离心 (3 000 × g, 10 min, 4 °C), 取上清液待测。使用福林酚试剂法测定胰蛋白酶 (TPS) 活性, 使用甲基试卤灵底物法测定脂肪酶 (LPS) 活性, 以及采用淀粉-碘比色法测定淀粉酶 (AMS) 活性。所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

血清、肝胰腺抗氧化能力相关指标测定 使用磷酸苯二钠法测定酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (AKP) 活性, 其活性单位定义为, 100 mL 血清或每克组织蛋白在 37 °C 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活性单位; 采用黄嘌呤氧化酶法 (羟胺法) 测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 其活性单位定义为, 在本反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活性单位 (U); 采用 ABTS 法测定总抗氧化能力 (T-AOC); 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法进行测定丙二醛 (MDA) 含量。所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

肌肉质构特性测定 解剖取新鲜腹部第三节肌肉, 使用 TMC-Pro 质构仪 (FTC 公司, 美国), 以质构剖面分析 (texture profile analysis, TPA) 方法测定肌肉的硬度、弹性、内聚性、黏附性、胶黏性和咀嚼性等指标。具体参数: P/50 柱形探头, 感应量程 1 000 N, 上升高度 20 mm, 形变量 70%, 检测速度 60 mm/min, 起始力 1 N, 间隔时间 5 s。每尾平行测定 3 次, 以平均值作为该样品的质构特性值。

肌肉氨基酸测定 新鲜的肌肉样品经冷冻干燥, 粉碎之后, 取 0.1 g 肌肉冻干样 (精确到 4 位小数) 采用盐酸水解法 (色氨酸除外) 测定结合氨基酸含量。具体操作: 将样品放入安瓿瓶中, 加入 6 mol/L 优级纯盐酸, 经超声和抽真空后封口, 110 °C 烘箱内水解 14 h, 静置 30 min, 取上清液 1 mL, 放在小瓶子内真空干燥, 加入 2 mL 0.1 mol/L 的盐酸回溶, 之后用注射器取 1 mL 用 0.22 μm 滤膜过滤, 上样, 采用氨基酸自动分析仪 (L-8900, 日立) 测定。

肠道微生物菌群分析 每组取 3 个样品进行肠道微生物多样性测序。取约 0.6 g 肠道内容物与黏膜混合样品, 采用 16S *rRNA* 基因测序并分析肠道微生物。在上海美吉生物医药科技有限公司完成测序工作, 通过 Illumina Miseq 平台进行高通量双末端测序。测序后使用 UPARSE 软件 (V 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行分类操作单元 (OTU) 聚类; 使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释。比对 Silva 数据库 (SSU123), 设置比对阈值为 70%。具体测定方法和分析方法参照 Yu 等^[21]。

1.5 统计方法

实验结果用平均值±标准差 (mean ± SD) 表示, 应用 SPSS 26.0 软件中独立样本 *t* 检验分析实验结果的差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 饲料水中稳定性

随着在水中浸泡时间的延长, 饲料的溶失率逐渐增大。在浸泡 1 h 时两组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 在分别浸泡 2、4、12 h 时, FF 组饲料溶失率均显著低于 CON 组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 浸泡不同时间对饲料溶失率的影响

Tab. 2 Effect of different feeding time on feed dissolution rate

时间/h time	组别 groups	
	CON	FF
1	15.77±0.12	15.56±0.46
2	18.59±0.42 ^b	16.96±0.06 ^a
4	20.62±0.03 ^b	19.63±0.03 ^a
12	25.36±0.04 ^b	21.56±0.04 ^a

2.2 生长性能

由表 3 可知, FF 组的增重率和特定生长率显著高于 CON 组 ($P < 0.05$), 饲料系数显著低于 CON 组 ($P < 0.05$), 肝体比、含肉率两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 3 发酵饲料对克氏原螯虾生长性能的影响

Tab. 3 Effect of fermented feed on growth performance of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups	
	CON	FF
初始体重/g IBW	4.76±0.09	5.05±0.096
终末体重/g FBW	18.88±0.16 ^a	24.46±0.32 ^b
增重率/% WGR	296.33±4.75 ^a	384.69±5.11 ^b
特定生长率/(%/d) SGR	1.97±0.02 ^a	2.25±0.02 ^b
饲料系数 FCR	1.90±0.06 ^b	1.74±0.02 ^a
存活率/% SR	75.00±8.66	86.67±5.77
肝体比/% HSI	7.05±0.51	6.43±0.49
含肉率/% FC	11.91±0.04	13.61±0.93

2.3 肌肉基本营养成分和质构特性分析

由表 4 可知, FF 组肌肉中粗蛋白、粗脂肪和灰分均高于 CON 组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); FF 组的硬度、弹性、胶黏性和咀嚼性显著高于 CON 组, 黏附性显著低于 CON ($P < 0.05$), 而内聚性两组间无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 5)。

2.4 肌肉氨基酸

克氏原螯虾肌肉中检测出了 17 种氨基酸 (表 6), 不同处理下克氏原螯虾肌肉氨基酸含量存在一定差异: 其中 FF 组异亮氨酸含量显著低于 CON 组 ($P < 0.05$); FF 组丝氨酸含量显著高于 CON 组 ($P < 0.05$); 其他氨基酸含量两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 4 发酵饲料对克氏原螯虾肌肉体成分的影响 (湿重)

Tab. 4 Effect of fermented feed on body composition in muscle of *P. clarkii* (wet mass) %

营养成分 nutrition composition	组别 groups	
	CON	FF
水分 moisture	78.80±0.01	78.61±0.01
粗蛋白质 crude protein	18.00±0.01	18.26±0.01
粗脂肪 crude lipid	2.46±1.13	2.57±1.07
灰分 ash	1.45±0.19	1.53±0.34

2.5 消化酶活性

发酵饲料可显著提高克氏原螯虾肝胰腺和肠道胰蛋白酶、脂肪酶活性 ($P<0.05$), 淀粉酶相较于 CON 组均无显著性差异 ($P>0.05$) (表 7)。

2.6 抗氧化能力指标

发酵饲料显著升高了血清和肝胰腺中 SOD、AKP 和 ACP 活性, 显著降低了 MDA 含量 ($P<$

表 5 发酵饲料对克氏原螯虾质构特性的影响

Tab. 5 Effect of fermented feed on flesh texture properties of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups	
	CON	FF
硬度/N hardness	23.21±2.40 ^a	29.93±3.52 ^b
黏附性/MJ adhesiveness	0.25±0.05 ^b	0.18±0.07 ^a
内聚性 cohesiveness	0.14±0.02	0.15±0.03
弹性/mm springiness	0.43±0.05 ^a	0.51±0.06 ^b
胶黏性/N gumminess	3.21±0.58 ^a	4.73±1.24 ^b
咀嚼性/MJ chewiness	1.45±0.45 ^a	2.43±0.82 ^b

0.05)。T-AOC 活性在肝胰腺中显著升高 ($P<0.05$), 而在血清中无显著性差异 ($P>0.05$) (表 8)。

2.7 肠道组织切片

对照组克氏原螯虾的绒毛长度和宽度分别为 (352.21±15.31) μm 和 (256.73±10.71) μm , 发酵饲

表 6 发酵饲料对克氏原螯虾肌肉氨基酸组成的影响 (湿重)

Tab. 6 Effect of fermented feed on muscle amino acid composition of *P. clarkii* (wet mass) %

种类 species	氨基酸名称 amino acid name	处理 groups	
		CON	FF
必需氨基酸 essential amino acid	精氨酸 Arg	1.83±0.06	1.86±0.02
	组氨酸 His	0.37±0.05	0.39±0.05
	异亮氨酸 Ile	0.67±0.05 ^b	0.64±0.05 ^a
	亮氨酸 Leu	1.26±0.02	1.25±0.04
	赖氨酸 Lys	1.30±0.01	1.29±0.02
	蛋氨酸 Met	0.61±0.01	0.60±0.02
	苯丙氨酸 Phe	0.63±0.02	0.63±0.01
	苏氨酸 Thr	0.62±0.01	0.63±0.02
	缬氨酸 Val	0.69±0.01	0.67±0.01
	非必需氨基酸 non-essential amino acid	丙氨酸 Ala	0.68±0.02
天冬氨酸 Asp		1.72±0.04	1.74±0.02
胱氨酸 Cys		0.16±0.01	0.16±0.01
甘氨酸 Gly		0.75±0.07	0.71±0.03
谷氨酸 Glu		2.65±0.02	2.69±0.06
脯氨酸 Pro		0.52±0.01	0.52±0.02
丝氨酸 Ser		0.69±0.03 ^a	0.72±0.01 ^b
酪氨酸 Tyr		0.55±0.01	0.56±0.03
氨基酸总量 ΣAA		15.71±0.15	15.70±0.02
必需氨基酸总量 ΣEAA		7.99±0.52	7.95±0.67
非必需氨基酸总量 ΣNEAA	7.72±0.09	7.76±0.05	
$\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{AA}$	0.51±0.01	0.50±0.01	
$\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{NEAA}$	1.04±0.01	1.02±0.01	

表 7 发酵饲料对克氏原螯虾肠道和肝胰腺消化酶活性影响

Tab. 7 Effects of fermented feed on digestive enzyme activities in intestine and hepatopancreas of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups	
	CON	FF
肝胰腺 hepatopancreas		
脂肪酶/(U/g prot) lipase	27.67±1.17 ^a	31.86±2.02 ^b
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	13.15±0.73	14.02±0.73
胰蛋白酶/(U/g prot) trypsin	5.46±2.05 ^a	6.55±1.18 ^b
肠道 intestine		
脂肪酶/(U/g prot) lipase	17.90±1.19 ^a	22.84±1.53 ^b
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	9.09±0.58	9.97±1.07
胰蛋白酶/(U/g prot) trypsin	4.36±1.26 ^a	5.63±1.41 ^b

表 8 发酵饲料对克氏原螯虾血清和肝胰腺抗氧化能力指标的影响

Tab. 8 Effects of fermented feed on serum and hepatopancreas antioxidant capacity indices of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups	
	CON	FF
肝胰腺 hepatopancreas		
总抗氧化能力/(U/mg prot) T-AOC	0.55±0.05 ^a	0.75±0.09 ^b
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	32.16±1.90 ^a	37.67±1.58 ^b
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	6.53±1.72 ^b	4.21±0.35 ^a
酸性磷酸酶/(U/mg prot) ACP	11.95±1.04 ^a	19.45±2.01 ^b
碱性磷酸酶/(U/mg prot) AKP	86.96±2.86 ^a	99.27±5.21 ^b
血清 serum		
总抗氧化能力/(U/mL) T-AOC	0.76±0.03	0.86±0.02
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	14.50±0.96 ^a	17.97±1.59 ^b
丙二醛/(nmol/mL) MDA	1.84±0.18 ^b	1.49±0.08 ^a
酸性磷酸酶/(U/L) ACP	10.40±0.11 ^a	15.40±0.26 ^b
碱性磷酸酶/(U/L) AKP	19.80±0.72 ^a	33.30±0.34 ^b

料组较对照组分别显著提高 24.14% 和 32.65% ($P < 0.05$)。

2.8 肠道微生物菌群

微生物物种多样性 肠道 16S *rDNA* 测序分析共获得 243 219 条序列, 每个样本测序量超过 35 000 条, 平均长度约为 418 bp; 各组克氏原螯虾共有 365 个 OUTs, 其中 CON 组特有 65 个 OUTs, FF 组特有 86 个 OUTs (图 1)。

Alpha 多样性 对克氏原螯虾肠道微生物 Alpha 多样性进行分析, 其结果显示, 各样本文库覆盖率 (coverage) 均超过 99.9%, 其中 FF 组的 Simpson 指数显著低于 CON 组 ($P < 0.05$), Chao1

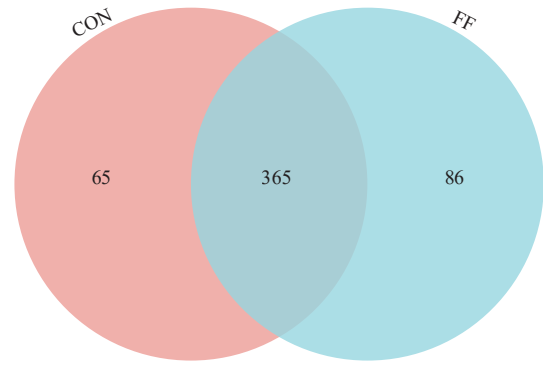


图 1 克氏原螯虾肠道微生物组成 Venn 图 (OUT 水平)

Fig. 1 Venn diagram of intestinal microbial composition of *P. clarkii* (OUT level)

指数、ACE 指数和 Shannon 指数均无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

肠道微生物群落组成 在门水平上, CON 组和 FF 组样品的肠道优势菌群组成相似, 其中厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 在各样本中变化较大, 相对丰度最高的是厚壁菌门, 之后依次是变形菌门、放线菌门和拟杆菌门 (Bacteroidota), 这 4 类优势菌群占肠道菌群的 90%, 排名前 6 的细菌丰度之和占比超过 98% (图 3-a, b)。在属水平上将相对丰度最高的 10 个属列出, 其中相对丰度较高的主要有 *Candidatus bacilloplasma*、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、弧

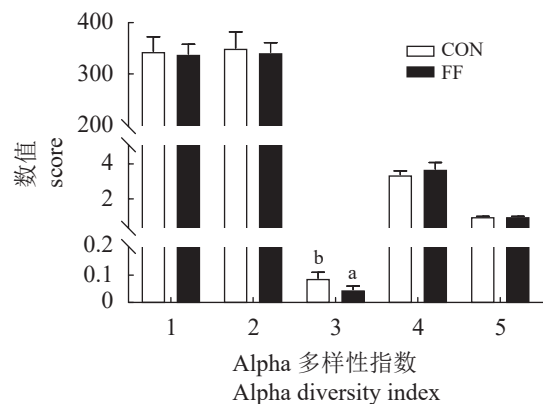


图 2 发酵饲料对克氏原螯虾 Alpha 多样性的影响

1. Chao 1 指数; 2. ACE 指数; 3. Simpson 指数; 4. Shannon 指数; 5. 覆盖率; 图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

Fig. 2 Effect of fermented feed on Alpha diversity of *P. clarkii*

1. Chao 1 index; 2. ACE index; 3. Simpson index; 4. Shannon index; 5. coverage index; different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$); the same below.

菌属 (*Vibrio*) 等 (图 3-c, d)。FF 组厚壁菌门和放线菌门相对丰度显著高于 CON 组 ($P<0.05$)。在属水

平上, FF 组 *C. bacilloplasma* 相对丰度显著低于 CON 组 ($P<0.05$) (图 4)。

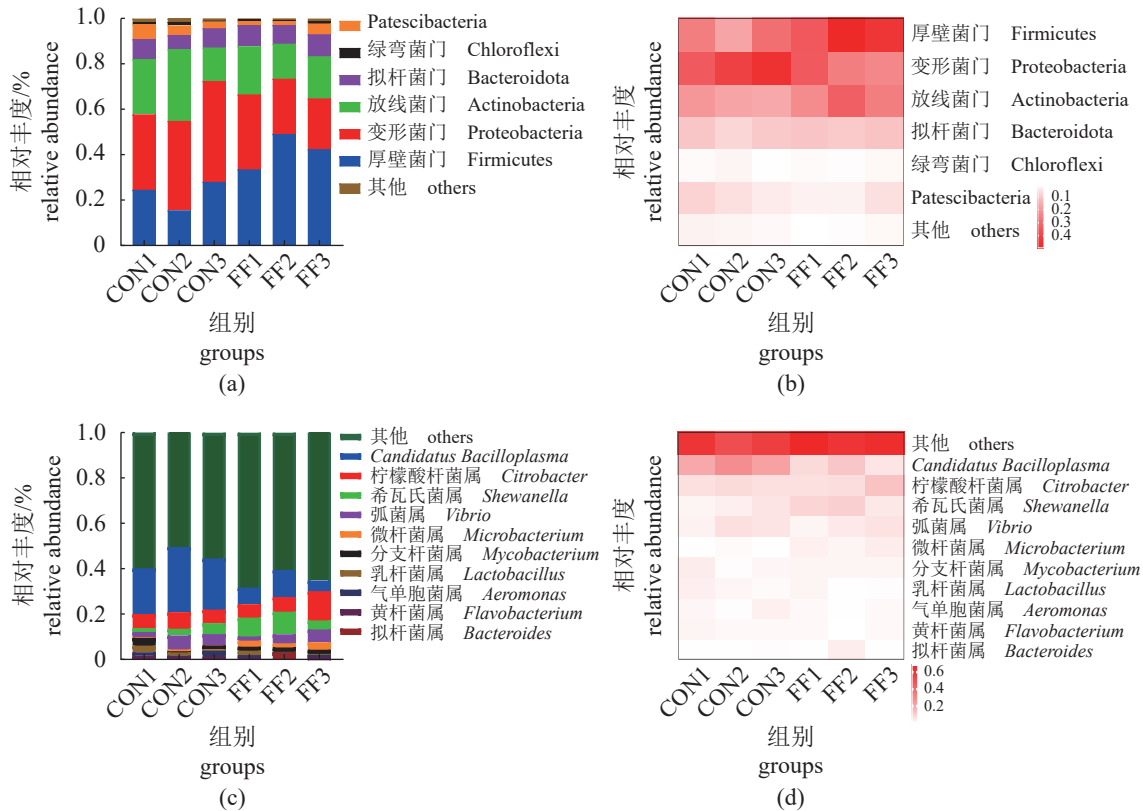


图 3 克氏原螯虾肠道微生物在门水平 (a)、(b) 和属水平上 (c)、(d) 的群落组成

Fig. 3 Community composition of intestinal microorganisms in *P. clarkii* at phylum level (a), (b) and genus level (c), (d)

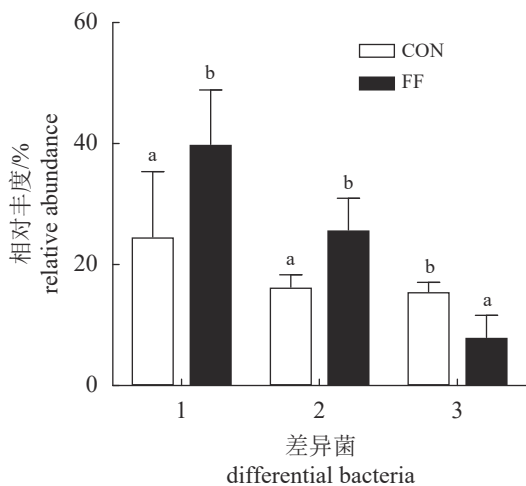


图 4 克氏原螯虾肠道微生物在门水平和属水平差异菌群分析

1. 厚壁菌门; 2. 放线菌门; 3. *C. bacilloplasma*。

Fig. 4 Analysis of the difference flora of intestinal microbes in *P. clarkii* at the phylum level and the genus level

1. Firmicutes; 2. Actinobacteria; 3. *C. bacilloplasma*.

肠道微生物功能预测 基于肠道微生物测序结果和 COG 数据库对克氏原螯虾肠道微生物群落功能进行 PICRUSt 预测分析, 结果表明, 在两组克氏原螯虾中, 能源生产和转化、氨基酸转运和代谢、转录、碳水化合物运输和代谢和无机离子的运输和代谢等功能占比较高。FF 组包括核苷酸转运和代谢、脂质运输和代谢、辅酶转运和代谢和复制、重组和修复等在内的 16 种功能相较 CON 组丰度增加 (图 5)。

3 讨论

3.1 发酵处理对饲料水稳定性的影响

颗粒饲料水中稳定性是评价水产饲料物理质量的参数之一^[22]。饲料制粒加工条件、饲料配方和黏合剂类型均会影响饲料水稳定性, 其中可控的加工条件如饲料水分、温度、螺杆速度和模具直径可直接影响饲料的物理性状, 一般认为较高水分和较小粒径的饲料颗粒具有更好的水稳定

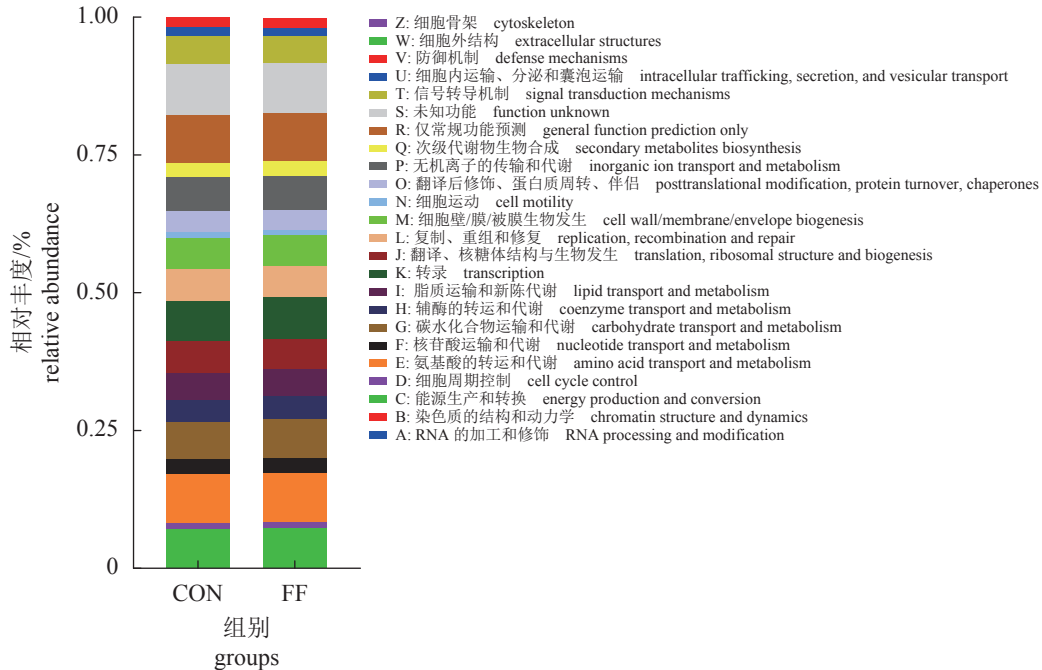


图 5 克氏原螯虾肠道微生物功能预测

Fig. 5 Prediction of intestinal microbial functions of *P. clarkii*

性^[23]。稳定性差的饲料颗粒会使营养物质快速流失, 从而导致动物生长不良、饲料系数增加和水质恶化等^[24]。在甲壳类动物的养殖过程中, 因其相对缓慢和间歇性的摄食, 以及在摄食时需通过口器和附足来获取食物等特殊的摄食行为^[25], 对饲料颗粒在水中稳定性有更高的要求。因此, 优质的甲壳动物饲料颗粒应在最初的 3 h 内具有良好的水稳定性^[26]。本实验中, 饲料经发酵处理后溶失率显著降低, 说明发酵有利于提高饲料颗粒水稳定性。究其原因, 可能是饲料在发酵过程中益生菌产生分解纤维的酶类将植物细胞壁中的纤维降解为水溶性碳水化合物^[27]以及增加饲料小肽含量, 增加了饲料中结合水的含量, 改变了原有饲料的物理性状, 从而增加饲料颗粒在水中稳定性, 其具体作用机理有待进一步研究。

3.2 发酵饲料对克氏原螯虾生长性能的影响

本研究中, 发酵饲料有效提高了克氏原螯虾生长性能, 这与在革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*)^[28]、凡纳滨对虾^[2,13-14]、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[3]、中华绒螯蟹^[5]、真鲷 (*Pagrus major*)^[7,15] 等研究中有相似结果。这可能是经益生菌发酵处理后, 饲料中的抗营养因子 (ANF) 被有效降解, 所包含的大分子物质被转化为更容易消化吸收的小肽和有机酸, 增加了饲料的营养价值, 并提高饲

料利用率, 进而促进动物生长^[3,10]。此外, 生长性能和饲料效率的增强还可能与消化酶活性的提高有关。消化酶的活性可反映机体对饲料的消化利用程度, 消化酶活性越高, 意味着机体对饲料的利用越充分^[29]。本研究中发酵饲料显著提高了克氏原螯虾胰蛋白酶和脂肪酶的活性, 进而提高了生长性能和饲料效率。

3.3 发酵饲料对克氏原螯虾肌肉营养价值的影响

本研究结果表明, 投喂发酵饲料对克氏原螯虾肌肉基本营养成分均无显著性影响, 这与发酵饲料在大口黑鲈^[3]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[30]、真鲷^[5] 等物种中的研究结果一致。然而, Xu 等^[5] 使用嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 发酵豆粕后替代部分鱼粉饲喂中华绒螯蟹, 显著提高了粗蛋白含量。造成这一差异的结果可能与菌株发酵、食物组成、动物种类和发育阶段有关。

水产品是人体获得必需氨基酸 (EAA) 的重要来源之一, 因此, EAA 的含量及比例是决定食物营养价值的重要指标^[31]。根据世界卫生组织 (WHO) 和联合国粮农组织 (FAO) 所提出的理想氨基酸模式, EAA 总量占氨基酸总量的百分比 (EAA/AA) 约为 0.40, (EAA/NEAA) 在 0.60 以上则被认为是质量较好的蛋白质^[32]。本实验中, 克氏原螯虾肌

肉中 EAA/AA (0.50~0.51) 和 EAA/NEAA (1.00~1.04) 均超过标准, 表明克氏原螯虾肌肉必需氨基酸满足率较高, 是一种营养价值较高的水产动物。

水产品的质构特性决定了其在食用时的口感, 日益受到消费者的重视^[33]。模拟鱼肉在口腔中的行为, 弹性越大, 咀嚼性越好, 肉质越爽脆^[34]。在本实验中, FF 组克氏原螯虾肌肉的硬度、弹性、咀嚼性较 CON 组显著上升, 说明投喂发酵饲料使得克氏原螯虾肌肉在被咀嚼时口感更佳。这可能与饲料经发酵处理后产生的小肽、氨基酸、核苷酸、壳聚糖和消化酶等营养成分有关^[35]。

3.4 发酵饲料对克氏原螯虾抗氧化能力的影响

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, 非特异性免疫酶活性的变化是衡量甲壳动物免疫功能状态的重要指标, 主要包括抗氧化酶系和非抗氧化酶系^[36]。抗氧化系统与水生动物的健康状况和免疫系统相关^[12], 包括 T-AOC 和 SOD^[2]。另外 MDA 是脂质过氧化的最终产物, 是内源性氧化损伤的重要生物标志物^[11]。此外, 磷酸酶被认为是探索细胞对有毒污染物应激反应的多功能酶生物标志物^[37]。AKP 的活性与环境密切相关, 在甲壳动物的防御机制中直接参与磷酸基团的转移和代谢, 具有防御的功能^[30]。ACP 是机体巨噬细胞溶酶体的一种符号酶, 主要参与细胞的吞噬、解体与吸收等过程, 反映了巨噬细胞的激活程度^[35]。本研究发现, 投喂发酵饲料显著提高了血清和肝胰腺 SOD、ACP 和 AKP 活性, 显著降低了 MDA 的含量, 显著提高肝胰腺 T-AOC 活性, 有效改善克氏原螯虾的抗氧化功能, 缓解克氏原螯虾的氧化应激, 增强了机体非特异性免疫能力。这与凡纳滨对虾^[13]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[6]、真鲷幼鱼^[15] 研究结果类似。

3.5 发酵饲料对克氏原螯虾肠道组织结构的影响

肠道是水产动物重要的消化场所, 肠道组织的完整性是行使消化功能的前提^[38]。虾类肠道中段上皮细胞游离面具有发达的微绒毛, 大大增加了消化和吸收的面积, 结缔组织和肌肉束中含有血窦可以进行营养物质的储存和运输^[38-39]。肠道组织绒毛高度、宽度、数量和形态结构在一定程度上反映肠道消化吸收能力的强弱^[40]。肌肉层与

水产动物肠道节律性蠕动相关, 其肌肉层完整度可反映肠道机械消化能力^[41-42]。本实验结果显示, 相较于 CON 组, FF 组肠道绒毛长度和宽度均显著高于 CON 组。究其原因可能是饲料经发酵处理后所包含的大分子物质转化为小肽^[3], 而小肽对肠道组织中刷状缘酶活性有一定的刺激作用, 并且可以加速肠道绒毛增长^[43-44]。这与发酵饲料在大口黑鲈^[3]、美国牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)^[10]、大菱鲆^[6,11] 等物种中的研究结果一致。总体来说, 消化酶活性越高, 意味着机体对饲料的利用越充分^[29], 而肠道组织结构完整、功能完善及肠道菌群组成的改变均会影响消化酶活性^[45]。

3.6 发酵饲料对克氏原螯虾肠道菌群的影响

肠道微生物的结构和组成影响着宿主的免疫应答、营养吸收和能量平衡^[29]。同时, 肠道微生物群落结构与功能紧密关联, 可以指示微生物评估宿主健康状况。水生动物肠道微生物区系的动态平衡受到许多因素的影响, 如自身的生理状态、饲料组成、外界压力和水环境等^[46]。有研究表明, 益生菌可以与宿主微生物竞争受体和结合位点, 超过其他微生物的生长从而影响宿主微生物区系, 促进宿主生理, 包括消化、免疫和维生素的合成^[2,10]。本研究在门水平上, 两组肠道优势菌群均为厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门。变形菌门是对摄入饮食表现敏感的一个门, 种类包括很多病原菌^[47], 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和霍乱弧菌 (*V. cholerae*), 已被认为是生物失调和疾病风险的潜在标志^[46,48-49]。厚壁菌门部分细菌将未消化的碳水化合物和氨基酸降解成短链脂肪酸, 促进克氏原螯虾的代谢功能^[50-51]。拟杆菌门对人体膳食纤维的降解起着重要作用^[14]。通过与宿主免疫系统的相互作用, 它还可以调节环境, 从而影响某些细菌的生长。此外, 放线菌门在维持肠道内稳态方面发挥了关键作用^[50]。本实验中, 投喂发酵饲料后克氏原螯虾肠道变形菌门丰度下降, 厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门丰度上升。在属水平上, 两组克氏原螯虾肠道菌群大多数没有明确分类, 其中发现摄食发酵饲料后显著下降了肠道中 *C. bacilloplasma* 丰度, 而柠檬酸杆菌属、希瓦氏菌属、弧菌属等条件致病菌丰度有所上升。有研究表明, 肠道菌群的生态失调会导致宿主暴发疾病^[51], Huang 等^[52]在研究肠道菌群的生态失调在凡纳滨对虾白便综合症 (WFS) 的致病作用中发现

病虾肠道菌群多富集弧菌属、*C. bacilloplasma* 和气单胞菌属 (*Aeromonas*), 而柠檬杆菌属、希瓦氏菌属、气单胞菌和弧菌属在病变的肠道中占主导地位^[2,46,50]。在本实验中, 虽然显著降低了 *C. bacilloplasma* 丰度, 但柠檬杆菌属、希瓦氏菌属、弧菌属等条件致病菌丰度均有所上升, 最终并没有引起克氏原螯虾暴发疾病, 分析可能因为发酵饲料促进有益菌在肠道内定植进而稳定了肠道菌群生态平衡, 其具体作用机理有待进一步研究。

在肠道微生物区系的预测功能分析中, 结果显示, 克氏原螯虾肠道菌群主要的功能与新陈代谢类功能有关, 包括能源生产和转化、氨基酸转运和代谢、碳水化合物运输和代谢、无机离子的运输和代谢、核苷酸转运、脂质运输和代谢等功能, 表明肠道菌群参与了机体代谢过程。在门水平上, 厚壁菌门和拟杆菌门较对照组丰度上升。厚壁菌门部分细菌参与将未消化的碳水化合物和氨基酸降解成短链脂肪酸, 促进克氏原螯虾的代谢功能^[47-48], 说明克氏原螯虾肠道内厚壁菌门和拟杆菌门可能在机体新陈代谢中发挥了关键作用, 但其具体作用机理, 有待进一步研究。

4 结论

饲料经发酵处理后可以增强饲料水中稳定性, 有效提高克氏原螯虾生长性能、肌肉品质、消化力、抗氧化能力, 改善肠道组织结构, 同时改变了克氏原螯虾肠道菌群结构, 提升了群落的多样性, 促进其他益生菌的生长, 发挥益生作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Dai Z L, Cui L, Li J, *et al.* Fermentation techniques in feed production[M]//Bazer F W, Lamb G C, Wu G Y. Animal agriculture: sustainability, challenges and Innovations. London: Academic Press, 2020: 407-429.
- [2] Zhang M Z, Pan L Q, Fan D P, *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.
- [3] Yang H, Bian Y H, Huang L L, *et al.* Effects of replacing fish meal with fermented soybean meal on the growth performance, intestinal microbiota, morphology and disease resistance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 22: 100954.
- [4] Hamidoghli A, Won S, Farris N W, *et al.* Solid state fermented plant protein sources as fish meal replacers in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 264: 114474.
- [5] Xu C Y, Liu W B, Zhang D D, *et al.* Effects of partial fish meal replacement with two fermented soybean meals on the growth of and protein metabolism in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100328.
- [6] Li C Q, Zhang B L, Zhou H H, *et al.* Beneficial influences of dietary *Aspergillus awamori* fermented soybean meal on oxidative homeostasis and inflammatory response in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 8-16.
- [7] Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Growth performance, blood health, antioxidant status and immune response in red sea bream (*Pagrus major*) fed *Aspergillus oryzae* fermented rapeseed meal (RM-Koji)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 253-262.
- [8] Lv J, Guo L J, Chen B X, *et al.* Effects of different probiotic fermented feeds on production performance and intestinal health of laying hens[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(2): 101570.
- [9] Rahimnejad S, Zhang J J, Wang L, *et al.* Evaluation of *Bacillus pumillus* SE5 fermented soybean meal as a fish meal replacer in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) feed[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735975.
- [10] Wang Z, Yang M Q, Wang L, *et al.* *Bacillus subtilis* LCBS1 supplementation and replacement of fish meal with fermented soybean meal in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) diets: effects on growth performance, feed digestibility and gut health[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737217.
- [11] Li C Q, Zhang B L, Liu C D, *et al.* Effects of dietary raw or *Enterococcus faecium* fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 261-271.
- [12] Rahimnejad S, Lu K L, Wang L, *et al.* Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japan-

- ese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 987-997.
- [13] Lin Y H, Chen Y T. *Lactobacillus* spp. fermented soybean meal partially substitution to fish meal enhances innate immune responses and nutrient digestibility of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diet with low fish meal[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737634.
- [14] Shao J C, Wang B J, Liu M, *et al.* Replacement of fishmeal by fermented soybean meal could enhance the growth performance but not significantly influence the intestinal microbiota of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2019, 504: 354-360.
- [15] Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*[J]. *Aquaculture*, 2018, 490: 228-235.
- [16] Yu J Y, Yu J Y, Chen X M, *et al.* Effects of fermented protein feed on the growth performance of pond-raised crab[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2019, 4(4): 149-155.
- [17] Luo S, Wang Z Y, Li X Q, *et al.* Feed deprivation over 16 days followed by refeeding until 75 days fails to elicit full compensation of *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture*, 2022, 547: 737490.
- [18] 中国小龙虾产业发展报告 (2021)[J]. 中国水产, 2021(7): 27-33.
Report on the development of Chinese crayfish industry (2021)[J]. *China Fisheries*, 2021(7): 27-33 (in Chinese).
- [19] 任妮, 戴红君, 张铮铮, 等. 我国克氏原螯虾产业调查分析与发展对策建议[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(19): 241-246.
Ren N, Dai H J, Zhang Z Z, *et al.* Investigation and analysis of China's crayfish industry and suggestions for development[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(19): 241-246 (in Chinese).
- [20] 黄鹏丹. 克氏原螯虾“五月瘟”新病毒性病原的发现及流行病学调查研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
Huang P D. Discovery and epidemiological investigation of a new viral pathogen of *Procambarus clarkii* "Black May"[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [21] Yu L J, Wen H, Jiang M, *et al.* Effects of ferulic acid on intestinal enzyme activities, morphology, microbiome composition of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed oxidized fish oil[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735543.
- [22] Obaldo L G, Divakaran S, Tacon A G. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water[J]. *Aquaculture Research*, 2002, 33(5): 369-377.
- [23] Rolfe L A, Huff H E, Hsieh F. The effect of processing conditions on the quality of extruded catfish feed[J]. *Transactions of the ASAE*, 2000, 43(6): 1737-1743.
- [24] 李宁, 任丽娜, 刘亮, 等. 一种新型饲料黏结剂对小龙虾饲料物理性能影响的研究[J]. *饲料博览*, 2021(10): 28-31.
Li N, Ren L N, Liu L, *et al.* Study on effect of a new feed binder on physical properties of crayfish feed[J]. *Feed Review*, 2021(10): 28-31 (in Chinese).
- [25] Aksoy B, Yildirim-Aksoy M, Jiang Z H, *et al.* Novel animal feed binder from soybean hulls -evaluation of binding properties[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2022, 288: 115292.
- [26] Volpe M G, Monetta M, Di Stasio M, *et al.* Rheological behavior of polysaccharide based pellets for crayfish feeding tested on growth in the crayfish *Cherax albidus*[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(2-4): 339-346.
- [27] 万里, 吴国芳, 王磊, 等. 复合益生菌发酵饲料发酵条件优化及品质鉴定[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(5): 3358-3375.
Wan L, Wu G F, Wang L, *et al.* Fermentation condition optimization and quality evaluation of feed fermented by compound probiotics[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(5): 3358-3375 (in Chinese).
- [28] Kari Z A, Kabir M A, Dawood M A O, *et al.* Effect of fish meal substitution with fermented soy pulp on growth performance, digestive enzyme, amino acid profile, and immune-related gene expression of African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737418.
- [29] 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、肝胰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).
- [30] Bai Z A, Ren T J, Han Y Z, *et al.* Effect of dietary bio-

- fermented selenium on growth performance, nonspecific immune enzyme, proximate composition and bioaccumulation of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2019, 13: 100180.
- [31] 田灿, 王美垚, 李建林, 等. 6个不同地理湖泊中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉组织氨基酸组成、营养评分及其差异性分析[J]. *淡水渔业*, 2021, 51(1): 28-37.
Tian C, Wang M Y, Li J L, et al. Studies on amino acid composition, nutritional scores and species identification of muscle tissues of *Eriocheir sinensis* from six different geographical lakes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(1): 28-37 (in Chinese).
- [32] Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition[J]. World Health Organization Technical Report Series, 2007(935): 1-265.
- [33] 程小飞, 宋锐, 向劲, 等. 不同养殖模式和野生克氏原螯虾肌肉营养成分分析与评价[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(4): 87-95.
Cheng X F, Song R, Xiang J, et al. Analysis and evaluation of different farming modes and nutrient composition of wild crawfish (*Procambarus clarkia*) muscle[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(4): 87-95 (in Chinese).
- [34] Conde-Petit B. Food texture and viscosity-concept and measurement: 2nd Edition M. Bourne. Academic Press, San Diego, 2002, ISBN: 0-12-119062-5[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2003, 36(2): 281.
- [35] 王天神. 生物发酵饲料对克氏原螯虾生长、营养成分、消化酶和免疫酶的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Wang T S. Effect of fermented biological feed on growth, nutritional components in muscle, digestive enzyme and non-specific immunity of *Procambarus clarkii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [36] 郭坤, 方刘, 孙柯, 等. 生物发酵饲料对池塘养殖克氏原螯虾生长性能、肌肉品质及免疫机能的影响[J]. *饲料研究*, 2020, 43(1): 18-21.
Guo K, Fang L, Sun K, et al. Effect of fermented biological feed on growth performance, fillet quality and immunity of *Procambarus clarkii* cultured in pond[J]. *Feed Research*, 2020, 43(1): 18-21 (in Chinese).
- [37] Chaudhary A, Hussain Z, Akram A M, et al. Impact of *Bacillus subtilis* supplemented feed on growth and biochemical constituents in *Labeo rohita* fingerlings[J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2021, 33(8): 101668.
- [38] 李礼, 姜海波, 姜志强, 等. 饲料添加杜仲皮水提物对虹鳟生长、肠道组织学及菌群多样性的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(4): 481-490.
Li L, Jiang H B, Jiang Z Q, et al. Effects of aqueous extract of *Eucommia ulmoides* Oliver bark on growth, and intestinal histology and microbiota diversity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(4): 481-490 (in Chinese).
- [39] 姜永华, 颜素芬, 陈政强. 南美白对虾消化系统的组织学和组织化学研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 58-62.
Jiang Y H, Yan S F, Chen Z Q. Histological and histochemical study of the digestive system of *Penaeus vannamei* Boone[J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(4): 58-62 (in Chinese).
- [40] 陈伟军, 朱传忠, 杨新冬, 等. 壳寡糖对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力和肠道结构的影响[J]. *饲料研究*, 2019, 42(12): 23-27.
Chen W J, Zhu C Z, Yang X D, et al. Effect of chitosan oligosaccharides on growth performance, oxidation resistance and intestinal structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Feed Research*, 2019, 42(12): 23-27 (in Chinese).
- [41] 程卓, 张国奇, 周陆, 等. 柠檬酸对草鱼生长性能、营养物质利用、血清生化指标和肠道组织形态的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4580-4591.
Cheng Z, Zhang G Q, Zhou L, et al. Effects of citric acid on growth performance, nutrient utilization, serum biochemical indices and intestinal tissue morphology of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4580-4591 (in Chinese).
- [42] 杨琳霖, 胡毅, 朱波, 等. 金针菇菇头对草鱼生长、消化酶活性、肠道组织结构、肌肉品质及血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4569-4579.
Yang L L, Hu Y, Zhu B, et al. Effects of *Flammulina velutipes* stembase on growth, digestive enzyme activities, intestinal tissue structure, muscle quality and serum biochemical parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4569-4579 (in Chinese).

- [43] Cheng Z Y, Chen S Q, An M L, *et al.* Effects of replacing fish meal with soybean meal, with or without dietary arginine, on growth performance, immune indices and intestinal morphology of grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(9): 2954-2964.
- [44] Ezquerro J M, García-Carreño F L, Carrillo O. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 1998, 163(1-2): 123-136.
- [45] Bamba T, Fuse K, Obata H, *et al.* Effects of small peptides as intraluminal substrates on transport carriers for amino acids and peptides[J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 1993, 15(1): 33-42.
- [46] Xu Y, Li Y Q, Xue M Y, *et al.* Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* YFI-SC2 on the growth performance, intestinal morphology, immune parameters, intestinal microbiota, and disease resistance of crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Animals*, 2021, 11(7): 1963.
- [47] 范晨薇. 丁酸梭菌对克氏原螯虾肠道健康的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Fan C W. Effects of clostridium butyricum on intestinal health of *Procambarus clarkii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [48] Xie M Q, Zhang S Y, Xu L L, *et al.* Comparison of the intestinal microbiota during the different growth stages of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 696281.
- [49] Wu Z B, Zhang Q Q, Zhang T L, *et al.* Association of the microbiota dysbiosis in the hepatopancreas of farmed crayfish (*Procambarus clarkii*) with disease outbreaks[J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736492.
- [50] Zhang Y, Sun K, Li Z Y, *et al.* Effects of acute diclofenac exposure on intestinal histology, antioxidant defense, and microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128130.
- [51] Zhang X, Deeke S A, Ning Z B, *et al.* Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2873.
- [52] Huang Z J, Zeng S Z, Xiong J B, *et al.* Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 32.

Effects of fermented feed on growth performance, muscle quality, antioxidant capacity and intestinal microflora in *Procambarus clarkii*

YAO Haihang^{1,2}, CHEN Xiaoru³, YUAN Hanwen¹, LUO Kai¹, FANG Liu¹,
CHEN Yi¹, GAO Weihua^{1*}, TIAN Juan^{2*}, LIU Yongsheng⁴

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

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. Healthy Aquaculture Key Laboratory of Sichuan Province, Tongwei Co., Ltd., Chengdu 610041, China;

4. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003, China)

Abstract: To explore the feeding effect of fermented formula feed in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), unfermented and fermented feeds were fed to juvenile *P. clarkii* [initial body weight (4.91±0.18) g] in an indoor circulating water system for eight weeks. The effects of fermented feed on growth, muscle quality, digestion, antioxidant capacity, and intestinal flora structure of *P. clarkii* were analyzed. The results showed that, ① the dissolution rate of fermented feed was significantly lower than that of unfermented feed. ② The fermented diet significantly increased weight gain rate, and specific growth rate. Furthermore, it decreased feed conversion ratio, but had no significant effect on survival rate, hepatosomatic index (HSI), flesh content, and body composition. ③ The fermented diet significantly improved muscle hardness, elasticity, chewiness and stickiness of *P. clarkii*, and decreased adhesion. ④ The fermented diet significantly increased the activities of trypsin and lipase in hepatopancreas and intestinal tract, the activities of superoxide dismutase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase in serum and hepatopancreas, and the total antioxidant capacity of the hepatopancreas. ⑤ The fermented feed significantly increased the length and width of intestinal villi. ⑥ The fermented feed improved the intestinal microbial structure of *P. clarkii*, significantly increased the relative abundance of Firmicutes and Actinobacteria, and increased the diversity of intestinal flora. Overall, the fermented feed effectively improved the growth performance, muscle quality, digestion, and antioxidant capacity by improving the intestinal tract tissue structure and changing the structure of intestinal microorganisms of *P. clarkii*.

Key words: *Procambarus clarkii*; fermented feed; growth performance; muscle quality; antioxidant capacity; intestinal flora

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

TIAN Juan. E-mail: tianjuan@yfi.ac.cn

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2022XT01); Key Research and Development Project of Sichuan Province (2018NZ0152); Industry-university-research Cooperation of Tongwei Co. Project (TW2018I001, 2011259); Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education (KFT202003, KFT202102); Hundreds of Schools and Counties Project from Department of Education of Hubei Province (BXLBX0312, BXLBX0306)