

脆化养殖对罗非鱼生长、血清生化指标及肠道健康的影响

罗文斌^{1,2,3}, 赵 岩^{1,2,3}, 郑 佳^{1,2,3}, 赵金良^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 为评价脆化养殖对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长、血清生化指标及肠道健康的影响,分别用蚕豆、脆化饲料(约含50%蚕豆)和普通饲料饲喂罗非鱼[体质量为(665±34)g],检测饲喂40和80 d后的罗非鱼生长、血清生化、肠道组织形态、紧密连接蛋白、消化酶、抗氧化酶、炎性基因以及肠道菌群指标。结果表明:与普通饲料组相比,蚕豆组和脆化饲料组罗非鱼体质量、体长和增重率显著降低。蚕豆组血清溶菌酶(LYZ)显著增加,血清碱性磷酸酶(AKP)无显著差异,80 d血清谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)升高,脆化饲料组血清ALT、AST和AKP无显著差异,LYZ显著升高。蚕豆组和脆化饲料组肠绒毛长度均缩短。蚕豆组紧密连接蛋白基因Occludin、ZO-3和Claudin-3表达显著下降,Claudin-12表达显著上升,脆化饲料组上述基因表达无显著差异。蚕豆组 α -淀粉酶和脂肪酶活性减小,脆化饲料组仅40 d脂肪酶活性减小。蚕豆组丙二醛(MDA)含量显著增加,80 d总抗氧化能力(T-AOC)显著增加,脆化饲料组MDA含量无显著差异,T-AOC显著下降。蚕豆组和脆化饲料组促炎基因IFN- γ 、TNF- α 和抗炎基因IgM表达水平显著增加,蚕豆组抗炎基因TGF- β 1和IL-10表达水平显著下降,脆化饲料组TGF- β 1和IL-10显著增加。脆化饲料组肠道微生物ACE、Chao1、Simpson和Shannon指数和对照组接近且高于蚕豆组,脆化饲料组毛螺菌属、乳酪杆菌丰度下降,分枝杆菌、多种梭菌丰度增加,蚕豆组厚壁菌门、梭杆菌门和鲸蜡杆菌属丰度下降,变形菌门、分枝杆菌等丰度增加。与饲喂40 d相比,饲喂80 d时脆化饲料组中大部分指标无显著变化。用蚕豆或脆化饲料养殖罗非鱼均会抑制其生长和肠道抗氧化能力,使肠绒毛变短,引起肠道炎症反应,使肠道有益菌丰度下降、潜在致病菌丰度增加,但脆化饲料对罗非鱼的不利影响弱于蚕豆,主要表现为脆化饲料对肠道消化酶活性、细胞膜通透性和抗炎系统无显著影响,蚕豆对上述指标均有显著负面影响。

关键词: 罗非鱼; 蚕豆; 脆化; 免疫; 肠道菌群

中图分类号: S 965.125

文献标志码: A

对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等鱼类投喂蚕豆(*Vicia faba* L.)或脆化饲料(含有蚕豆成分的配合饲料),可以使其肌肉的肌纤维密度、胶原蛋白含量、质构特性中的硬度和咀嚼性增加^[1],从而形成紧实爽脆的肉质口感,该现象即为脆化。脆化(脆肉)罗非鱼极大地促进了国内罗非鱼消费市场,已形成较完整的产业链。直接投喂蚕豆,虽脆化快,但脆化程度差异大,生长慢,目前以投喂脆化饲料为主,脆化更均匀,但因含有抗营养物质(生物碱、蚕豆凝集素等),饵料系数较高,脆化

时间较长。

除引起肌肉脆化,脆化养殖也会对鱼类造成其他影响,如肠道健康^[2-3]、溶血^[4]、活性氧(ROS)增加和氧化损伤^[5]、脂肪酸 β 氧化增强和碳水化合物代谢抑制^[6]等。其中,因为肠道健康会影响鱼类消化、生长和免疫而受到较多关注。研究^[7-10]表明,对草鱼投喂蚕豆后肠道微绒毛长度变短,抑制免疫基因表达,菌群多样性下降、有益菌数量减少,诱发肠道炎症等。与草鱼不同,罗非鱼属于杂食性鱼类,其消化系统脆弱,肠壁薄。秦志清^[11]发现对罗非鱼投喂脆化饲料(55%蚕

收稿日期: 2024-04-09 修回日期: 2024-09-20

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2400805)

作者简介: 罗文斌(1997—),男,硕士研究生,研究方向为水产养殖。E-mail: 2239227555@qq.com

通信作者: 赵金良, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

豆)后生长性能降低,肠道变形菌门和厚壁菌门丰度下降,但菌群功能未受明显影响。符兵等^[12]发现饲料中添加15%、30%、60%的蚕豆对罗非鱼的生长性能和肠道消化酶活性无显著影响,但会造成肠道微绒毛和上皮细胞受损,肠道菌群多样性下降,变形菌门、益生菌(鲸蜡杆菌)丰度降低。以上研究分析了脆化饲料对罗非鱼生长,肠道形态、消化酶和菌群的影响,尚无脆化养殖对罗非鱼肠道细胞膜通透性、抗氧化能力和免疫炎症反应影响的研究报道。

本实验在用蚕豆及脆化饲料饲喂罗非鱼40和80 d后,从机械屏障(肠道形态、紧密连接蛋白基因)、化学屏障(消化酶活性、抗氧化酶活性)、免疫屏障(免疫炎症基因)和生物屏障(肠道菌群)4个方面研究罗非鱼肠道健康,并结合生长、血清生化指标进行综合分析,旨在丰富脆化养殖对罗非鱼肠道健康影响的基础数据,加深对这一现象的理解,以为罗非鱼脆化专用饲料开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计及实验材料

所有样本采集、实验流程、研究方法均严格按照《上海海洋大学实验室动物伦理规范》和上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

实验用罗非鱼来自广东省茂名市茂名伟业罗非鱼良种场。因为从幼鱼开始脆化养殖生长慢、成本高、死亡率高,所以生产中通常以接近出

塘规格的成鱼开始脆化养殖,经2~3个月即可达到脆化上市要求。本实验参照生产实践,选择规格一致[体质量为(665±34)g]、健康状况良好的罗非鱼进行脆化养殖。

对照组饲料为商用罗非鱼膨化配合饲料(原料组成:豆粕30%、鱼粉3%、面粉12%、小麦次粉21.5%、菜粕30%、磷酸二氢钙1.5%、维生素及矿物质预混料2%)。蚕豆为产地云南的干蚕豆,投喂前冷水浸泡24 h,破碎机破碎后直接投喂。脆化罗非鱼专用饲料(原料组成:蚕豆50%、面粉12%、鱼粉3%、豆粕30%、磷酸二氢钙1.5%、鱼油1.5%、维生素及矿物质预混料2%)购买自茂名鸿业水产有限公司,饲料组成和主要营养成分由饲料厂家提供,见表1。

养殖实验在茂名伟业罗非鱼良种场室外水泥池进行。从养殖池里挑选1 800尾罗非鱼转移至养殖场室外水泥池中(3 m×4 m×1 m),每个水泥池200尾。实验分为3组,对照组、蚕豆组、脆化饲料组,每组3个重复,实验周期80 d,全养殖周期各组均投喂对应的单一饲料。养殖期间,水温控制在27~31℃,连续充氧(6~8 mg/L),控制pH和氨氮等水体指标。每天饱食投喂(日投喂量为体质量的3%)2次(8:00~9:00,17:00~18:00),摄食结束后60 min,清理残饵,每2周换水1次。

分别在饲喂40和80 d时采样,各组随机挑选20尾,测量体长、体质量,计算增重率。计算公式:

$$W_{GR}=100\%\times(W_t-W_0)/W_0 \quad (1)$$

式中: W_{GR} 为增重率,%; W_t 分别为40或80 d时各组罗非鱼体质量,g; W_0 为初始体质量,g。

表1 饲料主要营养成分
Tab. 1 Main nutrient components of feed

分组 Group	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	粗灰分 Crude ash	水分 Moisture content	粗纤维 Crude fiber
对照组饲料 Ordinary feed	31.1	3.0	12.0	11.0	10.0
脆化饲料 Crisp feed	29.0	6.0	8.0	12.9	10.0
蚕豆 Faba bean	28.2	0.8	2.7	13.0	6.7

用MS-222麻醉液(质量浓度为400 mg/L)麻醉,尾柄静脉取血,3 000 r/min,4℃离心15 min,取上层清液置于-20℃保存;解剖后取前肠前段用Bouin's液固定24 h,换70%乙醇溶液浸泡,4℃冰箱保存;取前肠后段用无酶水冲洗后,液氮速冻,-80℃冰箱保存;取中后肠,用消毒镊子挤出肠

道内容物于冻存管中,液氮速冻,-80℃冰箱保存。

1.2 实验方法

1.2.1 血清指标测定

血清谷草转氨酶(AST)(南京建成生物工程有限公司)、谷丙转氨酶(ALT)(南京建成生物工程有限公司)、溶菌酶(LYZ)(宝如亿ELISA)、碱性磷

酸酶(AKP)(北京索莱宝科技有限公司)含量分别使用试剂盒测量,操作步骤参考试剂盒说明书。

1.2.2 组织切片

取固定好的前肠组织,80%~100% 梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。切片后 H.E 染色,中性树胶封片后制成肠道组织切片。将组织切片置于显微镜(尼康 ECLIPES 80i)下观察拍照,并用 Imager 软件统计分析。

1.2.3 消化酶和抗氧化酶活性测定

取冻存的前肠组织,称取样本质量,与 PBS 缓冲液按 1:9 比例混合匀浆,匀浆液置 4℃下 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,分别用于测定脂肪酶(LPS)、α-淀粉酶(AMS)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)。以上酶活和蛋白含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒,操作

步骤参考说明书。

1.2.4 基因表达

采用 TRIzol 法提取肠组织总 RNA,并测定 RNA 质量和完整性。使用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。基于 NCBI 数据库获得罗非鱼 *Occludin*、*ZO-3*、*Claudin-3*、*Claudin-12*、*IL-1β*、*IFN-γ*、*TNF-α*、*TGF-β1*、*IL-10* 和 *IgM* 基因序列,以 *β-actin* 为内参基因,在 Primer-BLAST 程序中设计引物,在上海金唯智生物科技有限公司进行引物合成,引物序列见表 2。实时荧光定量 PCR 反应体系 20.0 μL: 2×SYBR Green Prc *Taq* HS Premix, 10 μL; cDNA 1 μL; Primer F 0.4 μL; Premix R 0.4 μL; RNase free water 8.2 μL。反应程序:95℃ 30 s; 95℃ 8 s, 56℃ 30 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔC_t} 法换算目的基因的相对表达量。

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增引物序列
Tab. 2 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR amplification

基因编号 Gene number	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃
XM_003455949.5	<i>β-actin</i> -F	5'-CGAGAGGGAAATCGTGC GTGACA-3'	59.0
	<i>β-actin</i> -R	5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGGGC-3'	
XM_003445131.5	<i>Occludin</i> -F	5'-TGGTTGTCATCGCCTTGAGT-3'	59.0
	<i>Occludin</i> -R	5'-CCACATTGTTCA CCGAGTCT-3'	
XM_013267128.3	<i>ZO-3</i> -F	5'-GACCGCCTCCAGATGATTCC-3'	59.0
	<i>ZO-3</i> -R	5'-AATCCCAGACCTGATGGTGC-3'	
XM_005465025.4	<i>Claudin-3</i> -F	5'-CTCCTGATTCTGGGTGGTGG-3'	59.0
	<i>Claudin-3</i> -R	5'-TTCTAAACCTTGGGCACCGA-3'	
XM_005472700.3	<i>Claudin 12</i> -F	5'-CGCAGTGGCGTATAACGAAA-3'	58.2
	<i>Claudin 12</i> -R	5'-CAACTTGGAGTACCACTCTGAA-3'	
XM_025902124.1	<i>TNF-α</i> -F	5'-AGGGTGATCTGCGGGAATACT-3'	59.0
	<i>TNF-α</i> -R	5'-GCCCAGGTAAATGGCGTTGT-3'	
XM_019365842.2	<i>IL-1β</i> -F	5'-AGCATTGTGGAAGAGCACAGT-3'	57.2
	<i>IL-1β</i> -R	5'-CCATGCTGCTGTGGAGAAGA-3'	
XM_031737173.2	<i>IFN-γ</i> -F	5'-GAAACTTCTGCAGGGATTGG-3'	58.2
	<i>IFN-γ</i> -R	5'-CTCTGGATCTTGATTTCGGG-3'	
XM_013269189.3	<i>IL-10</i> -F	5'-GAGATGTCACCCAGTGTAGGAA-3'	57.2
	<i>IL-10</i> -R	5'-TGTGTCGTTTAGAAGCCAGGT-3'	
XM_039622897.1	<i>TGF-β1</i> -F	5'-CTGGCTCCAAGGGAATGAGAAT-3'	59.0
	<i>TGF-β1</i> -R	5'-CCCTCCTGCTCATAGTCCCA-3'	
XM_025906582.1	<i>IgM</i> -F	5'-ACGAGGAAGCAGACTCAAGTTAT-3'	59.0
	<i>IgM</i> -R	5'-ACAATAGCTCTAGTTGTGTTAACC-3'	

1.2.5 肠道菌群分析

取 80 d 罗非鱼前肠组织,使用 Fast DNASPIN KitforFeces (MPBiomedical)试剂盒提取细菌总 DNA。使用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量和浓度。细菌 16sv3+v4 区域用引物(F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增。

由北京百迈客生物科技有限公司进行测序和数据分析。

1.2.6 统计分析

使用 SPSS 26.0 软件进行双因素方差分析。结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示, *P*<0.05 为差异显著。

2 结果

根据双因素方差分析,采样时间和饲料组成对罗非鱼 LYZ 活性、肠道绒毛长度、T-AOC、MDA 含量、IgM 和 IL-10 基因表达量存在显著交互作用 ($P<0.05$),对其他测量指标交互作用不显著 ($P>0.05$)。

LYZ 活性的饲料与时间交互作用: $F=4.043$, $P=0.021$; 绒毛长度的饲料与时间交互作用: $F=7.857$, $P=0.001$; T-AOC 的饲料与时间交互作用: $F=11.837$, $P=0.001$; MDA 含量的饲料与时间交互作用: $F=3.873$, $P=0.04$; IgM 表达量的饲料与时间

交互作用: $F=4.191$, $P=0.022$; IL-10 表达量的饲料与时间交互作用: $F=8.564$, $P=0.001$ 。 F 为 2 个均方比值(效应项/误差项), P 为判定假设检验的参数。

2.1 脆化养殖对罗非鱼生长性能和存活率的影响

在饲喂 40 和 80 d 时蚕豆组体质量、体长和增重率显著小于对照组和脆化饲料组 ($P<0.05$), 在饲喂 40 d 时脆化饲料组仅体质量显著小于对照组 ($P<0.05$), 在饲喂 80 d 时脆化饲料组体质量、体长和增重率显著小于对照组 ($P<0.05$)。对照组、蚕豆组和脆化饲料组 3 组间存活率无显著差异 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 不同投喂组罗非鱼生长性能和存活率
Tab. 3 Growth performance indicators of tilapia in different feeding groups

生长指标 Growth indexes	时间 Time/d	对照组 Ordinary group	蚕豆组 Faba bean group	脆化饲料组 Crisp feed group
	0(初始)	685±21	685±35	625±21
体质量 Body mass/g	40	1 380±240 ^a	940±110 ^c	1 240±240 ^b
	80	1 590±260 ^{a*}	1 080±180 ^{c*}	1 350±300 ^b
体长 Body length/cm	40	31.63±1.61 ^a	29.33±1.45 ^b	30.65±1.98 ^a
	80	33.80±1.94 ^{a*}	31.00±1.55 ^{c*}	32.45±2.06 ^{b*}
增重率 Weight gain rate/%	40	105±36 ^a	38±16 ^b	92±36 ^a
	80	136±39 ^{a*}	60±28 ^{c*}	110±39 ^b
存活率 Survival rate/%	40	98.30	100.00	96.70
	80	98.30	95.00	96.70

注:不同字母上标表示在同一时间不同饲料组间差异显著 ($P<0.05$), *表示在同一组 40 与 80 d 之间差异显著 ($P<0.05$)。

Notes: Different superscripts indicate significant differences between different feed groups at the same time ($P<0.05$), while * indicates significant differences between the same group at 40 and 80 days ($P<0.05$).

2.2 脆化养殖对罗非鱼血清生化指标的影响

和对照组比较,ALT 活性在饲喂 80 d 蚕豆组中显著升高 ($P<0.05$),在脆化饲料组中无显著变化 ($P>0.05$);AST 活性在脆化饲料组中无显著差异 ($P>0.05$),在饲喂 80 d 蚕豆组中活性升高;AKP 活性在蚕豆组和脆化饲料组无显著差异 ($P>0.05$);LYZ 活性在蚕豆组和脆化饲料组均显著升高 ($P<0.05$),见表 4。

2.3 脆化养殖对罗非鱼肠道形态的影响

对照组肠道结构完整,纹状缘表面平滑,肠绒毛分支多且分布较为紧密(图版)。蚕豆组和脆化饲料组肠绒毛分支少,褶皱少且分布较为稀疏,杯状细胞增多(图版)。蚕豆组和脆化饲料组肠绒毛长度较对照组显著缩短 ($P<0.05$),饲喂 80 d 时蚕豆组肠绒毛长度较脆化饲料组显著缩短 ($P<0.05$),见表 5。

2.4 脆化养殖对罗非鱼肠道紧密连接蛋白基因表达的影响

和对照组比, Occludin、ZO-3、Claudin-12 和 Claudin-3 表达量在脆化饲料组中无显著变化 ($P>0.05$)。Occludin、ZO-3 和 Claudin-3 表达量在蚕豆组中显著下降,但 Claudin-12 表达量显著上升 ($P<0.05$),见图 1。

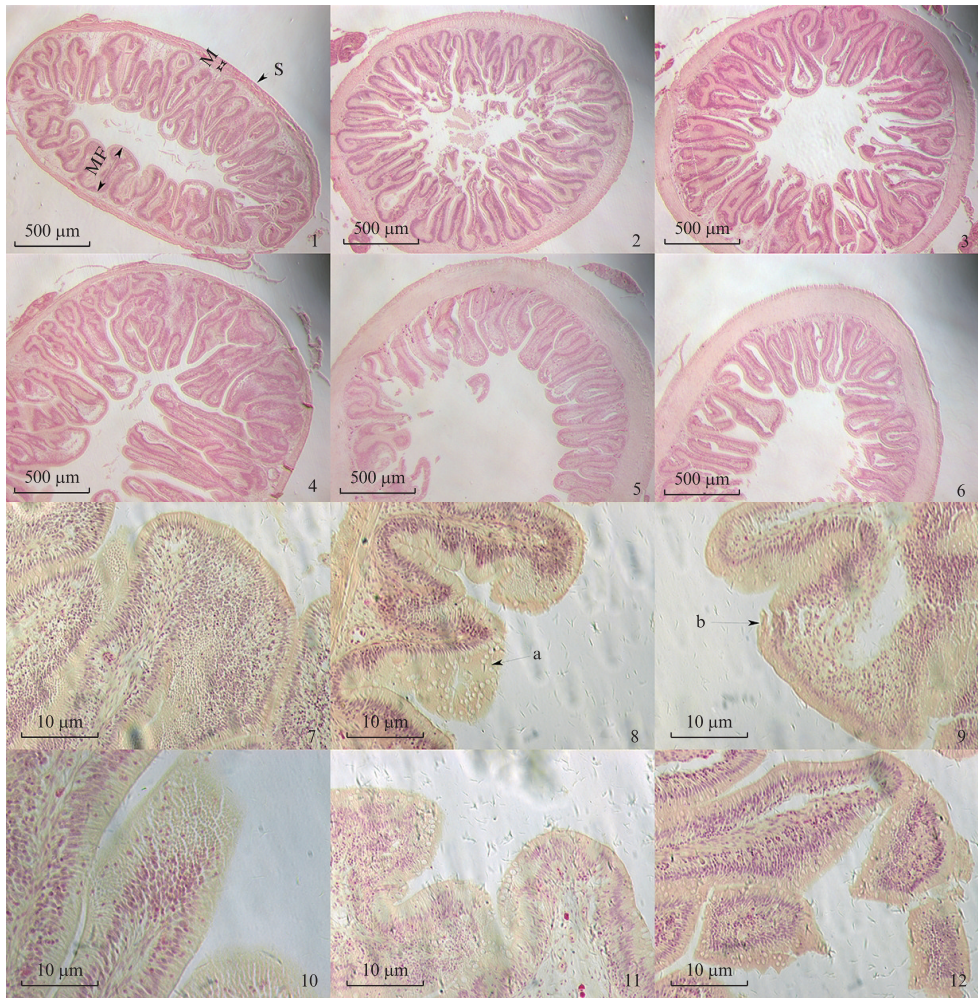
2.5 脆化养殖对罗非鱼肠道消化酶活性的影响

和对照组比, α -淀粉酶活性在蚕豆组中显著降低 ($P<0.05$),在脆化饲料组中无显著变化 ($P>0.05$),脂肪酶活性在饲喂 40 d 的蚕豆组和脆化饲料组中均显著降低,在饲喂 80 d 的蚕豆组显著降低 ($P<0.05$),在饲喂 40 d 和饲喂 80 d 间,脆化饲料组中仅 α -淀粉酶和脂肪酶活性差异显著 ($P<0.05$),见表 6。

表 4 不同投喂组罗非鱼血清生化指标变化
Tab. 4 Changes of serum biochemical indexes of tilapia in different feeding groups

项目 Items	时间 Time/d	对照组 Ordinary group	蚕豆组 Faba bean group	脆化饲料组 Crisp feed group
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	40	8.33±0.28 ^a	43.69±16.62 ^a	9.17±3.77 ^a
	80	8.50±0.28 ^b	59.36±25.02 ^a	5.10±2.14 ^b
谷草转氨酶 AST/(U/L)	40	36.06±6.95	40.11±6.94	37.52±6.14
	80	39.52±4.39 ^b	67.24±14.20 ^{a*}	42.38±9.15 ^b
碱性磷酸酶 AKP/(U/mL)	40	0.017 0±0.002 6 ^{ab}	0.025 0±0.001 4 ^a	0.010 0±0.001 1 ^b
	80	0.019 0±0.002 4	0.023 0±0.004 4	0.015 0±0.002 5
溶菌酶 LYZ/(μg/L)	40	14.56±0.70 ^c	26.20±1.37 ^{a*}	19.38±0.81 ^b
	80	14.39±0.61 ^c	20.85±0.85 ^a	17.28±0.74 ^b

注:不同字母上标表示在同一时间不同饲料组间差异显著($P<0.05$), *表示在同一组 40 与 80 d 之间显著差异($P<0.05$)。
Notes: Different superscripts indicate significant differences between different feed groups at the same time ($P<0.05$), while * indicates significant differences between the same group at 40 and 80 days ($P<0.05$).



1. 40 d 对照组 (4×); 2. 40 d 蚕豆组 (4×); 3. 40 d 脆化饲料组 (4×); 4. 80 d 对照组 (4×); 5. 80 d 蚕豆组 (4×); 6. 80 d 脆化饲料组 (4×); 7. 40 d 对照组 (20×); 8. 40 d 蚕豆组 (20×); 9. 40 d 脆化饲料组 (20×); 10. 80 d 对照组 (20×); 11. 80 d 蚕豆组 (20×); 12. 80 d 脆化饲料组 (20×); M. 肌层; MF. 肠绒毛; S. 浆膜层; a. 杯状细胞; b. 绒毛损伤。
1. 40 d control group (4×); 2. 40 d faba bean group (4×); 3. 40 d of brittle feed group (4×); 4. 80 d control group (4×); 5. 80 d faba bean group (4×); 6. 80 d brittle feed group (4×); 7. 40 d control group (20×); 8. 40 d faba bean group (20×); 9. 40 d brittle feed group (20×); 10. 80 d control group (20×); 11. 80 d faba bean group (20×); 12. 80 d of brittle feed group (20×); M. Muscle layer; MF. Intestinal villi; S. Serosal layer; a. Goblet cells; b. Villous injury.

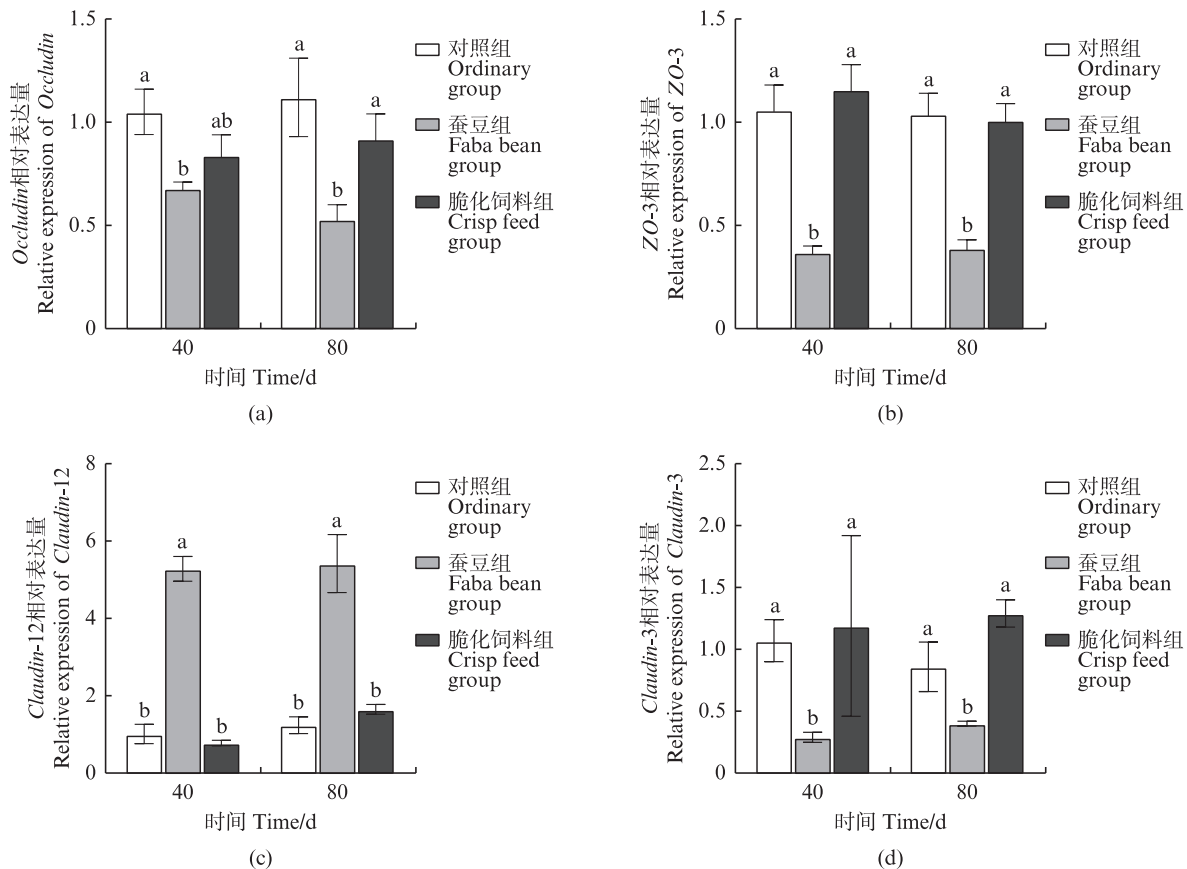
图版 不同投喂组罗非鱼肠道形态
Plate Morphological structure of intestinal tissue of tilapia in different feeding groups

表 5 不同投喂组罗非鱼肠道绒毛长度
Tab. 5 Intestinal villus of tilapia in different feeding groups

时间 Time/d	对照组 Ordinary group/ μm	蚕豆组 Faba bean group/ μm	脆化饲料组 Crisp feed group/ μm
40	602.72 \pm 16.31 ^a	458.59 \pm 19.94 ^b	461.66 \pm 12.20 ^b
80	688.84 \pm 24.44 ^{a*}	410.00 \pm 21.76 ^c	540.37 \pm 14.40 ^{b*}

注:不同字母上标表示在同一时间不同饲料组间差异显著($P<0.05$), *表示在同一组 40 d 与 80 d 之间显著差异($P<0.05$)。

Notes: Different superscripts indicate significant differences between different feed groups at the same time ($P<0.05$), while * indicates significant differences between the same group at 40 and 80 days ($P<0.05$).



柱状图上方不同字母代表差异显著($P<0.05$)。

Different letters above the bar chart represent significant differences ($P<0.05$).

图 1 不同投喂组罗非鱼肠道紧密连接蛋白基因相对表达量

Fig. 1 Relative expression of intestinal tight junction protein genes of tilapia in different feeding groups

表 6 不同投喂组罗非鱼肠道消化酶活性
Tab. 6 Intestinal digestive enzyme activity of tilapia in different feeding groups

项目 Items	时间 Time/d	对照组 Ordinary group	蚕豆组 Faba bean group	脆化饲料组 Crisp feed group
α -淀粉酶 AMS/(U/mg prot)	40	0.051 \pm 0.014 ^a	0.029 \pm 0.001 ^b	0.051 \pm 0.001 ^{ab}
	80	0.062 \pm 0.013 ^{ab}	0.032 \pm 0.010 ^b	0.087 \pm 0.019 ^{a*}
脂肪酶 LPS/(U/g prot)	40	0.760 \pm 0.090 ^a	0.590 \pm 0.048 ^b	0.600 \pm 0.058 ^b
	80	0.880 \pm 0.068 ^a	0.440 \pm 0.030 ^b	0.890 \pm 0.150 ^{a*}

注:不同字母上标表示在同一时间不同饲料组间差异显著($P<0.05$), *表示在同一组 40 d 与 80 d 之间显著差异($P<0.05$)。

Notes: Different superscripts indicate significant differences between different feed groups at the same time ($P<0.05$), while * indicates significant differences between the same group at 40 and 80 days ($P<0.05$).

2.6 脆化养殖对罗非鱼肠道抗氧化能力的影响

与对照组相比,总抗氧化能力在脆化饲料组

中显著下降,在饲喂 80 d 的蚕豆组中显著增加 ($P<0.05$),MDA 含量在蚕豆组中显著增加 ($P<$

0.05),在脆化饲料组中无显著变化($P>0.05$),见表7。

2.7 脆化养殖对罗非鱼肠道炎性基因的表达

和对照组相比,*IL-1 β* 表达量在蚕豆组和脆化饲料组中无显著变化($P>0.05$,图2a),*IFN- γ* 表达量在饲喂80 d时的蚕豆组和脆化饲料组中显著增加($P<0.05$,图2b),*TNF- α* 表达量在蚕豆组和饲喂40 d脆化饲料组均显著增加($P<0.05$,图2c),*TGF- β 1*和*IL-10*表达量在蚕豆组显著减小($P<0.05$,图2d和2e),在脆化饲料组显著增加($P<0.05$),*IgM*表达量在蚕豆组和脆化饲料组均显著增加($P<0.05$,图2f)。在40 d和80 d间,脆化饲料组中仅*IL-10*表达量差异显著($P<0.05$,图2e)。

2.8 脆化养殖对罗非鱼肠道微生物的影响

2.8.1 肠道微生物多样性

根据肠道微生物OUT数量进行Alpha多样性指数分析。结果显示,对照组和脆化饲料组的ACE指数、Chao1指数、Simpson指数和Shannon指数接近且高于蚕豆组($P<0.05$),见表8。

2.8.2 肠道微生物物种组成

OUT数量分别为蚕豆组1 697、脆化饲料组2 980、对照组3 078,共有OUT数量为16,蚕豆组OUT数量远小于其他2组(图3a)。主成分分析(PCA)表明3组彼此各有差异,脆化饲料组介于蚕豆组和对照组之间(图3b)。

在门水平上,3组的核心菌群种类基本一致,丰度总和均在90%以上,主要为蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、拟杆菌门

(Bacteroidota)、放线菌门(Actinobacteriota),见图3c。和对照组相比,蚕豆组变形菌门、放线菌门丰度显著增加($P<0.05$),厚壁菌门、梭杆菌门、蓝藻门等丰度显著减小($P<0.05$,表9)。脆化饲料组蓝藻门和浮霉菌门(Planctomycetota)丰度显著减小($P<0.05$,表10)。

属水平上,和对照组相比,蚕豆组鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)和未分类蓝藻细菌(unclassified_Cyanobacteriales)等丰度显著下降($P<0.05$),分支杆菌属(*Mycobacterium*)、衣原体(*Neochlamydia*)和副球菌属(*Paracoccus*)等丰度显著增加($P<0.05$,图3d)。脆化饲料组未分类蓝藻细菌等丰度显著下降($P<0.05$),分支杆菌属、衣原体、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)和狭义的梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto*)等丰度显著增加($P<0.05$)。

2.8.3 肠道菌群功能基因预测

3组富集丰度排序前10的KEGG通路如图4a所示。

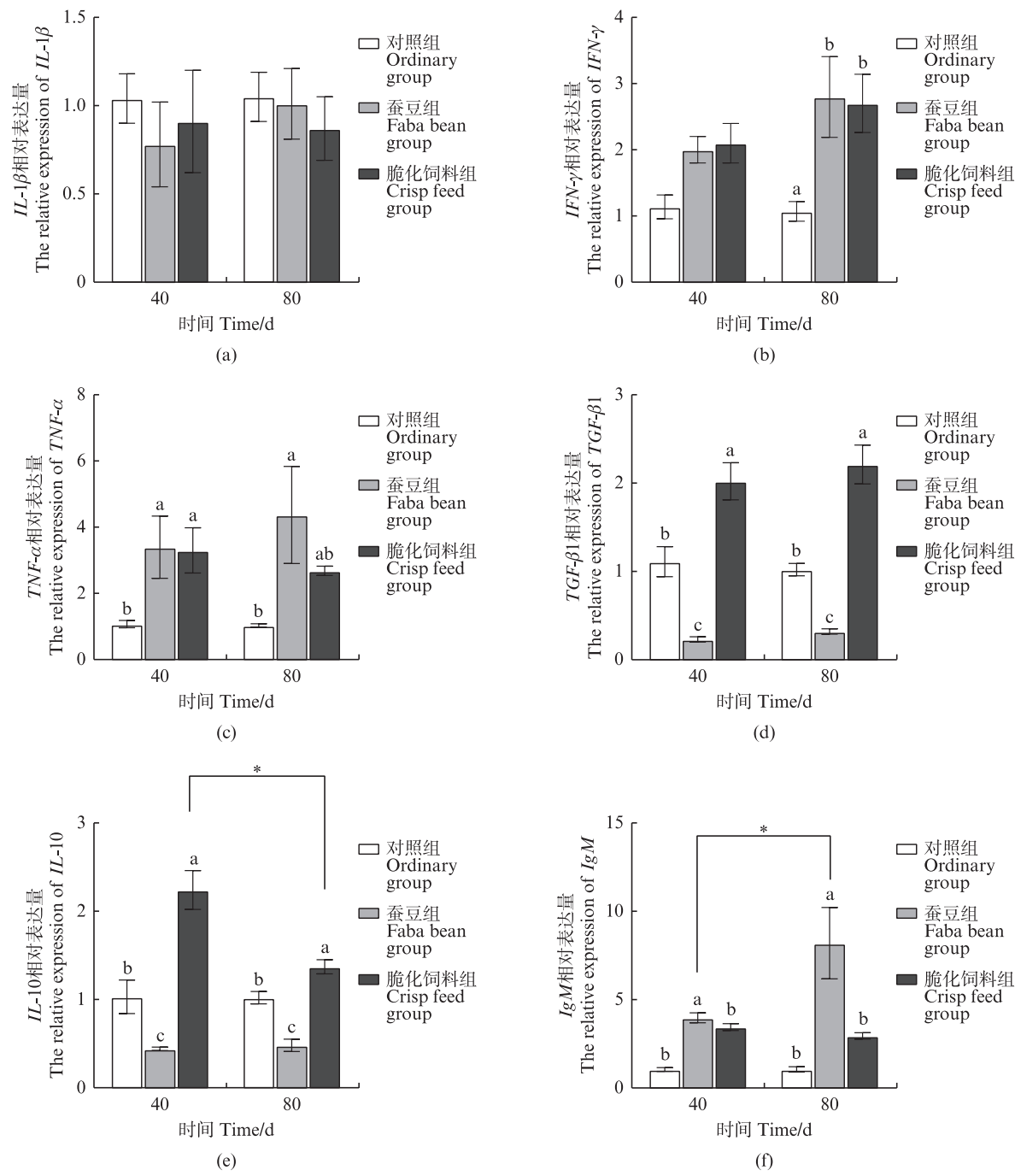
与对照组比较(图4b),蚕豆组在KEGG功能富集通路的前30个中有13个显著下调,9个显著上调($P<0.05$)。主要富集在氨基酸合成代谢相关通路,如氨基酸的生物合成,半胱氨酸、蛋氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解;碳水化合物代谢,如丁酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,丙酸代谢,2-草酸代谢;其他物质代谢和次生代谢产物合成等。

脆化饲料组仅原核生物中碳固定途径差异显著($P<0.05$,图4c)。

表7 不同投喂组罗非鱼肠道抗氧化能力
Tab. 7 Intestinal antioxidant capacity of tilapia in different feeding groups

项目 Items	时间 Time/d	对照组 Ordinary group	蚕豆组 Faba bean group	脆化饲料组 Crisp feed group
总抗氧化能力 T-AOC/(mmol/g prot)	40	0.29±0.030 ^a	0.26±0.040 ^{ab}	0.19±0.024 ^b
	80	0.29±0.025 ^b	0.49±0.070 ^{**}	0.19±0.022 ^c
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	40	0.20±0.047 ^b	1.41±0.48 ^{as}	0.32±0.047 ^b
	80	0.20±0.045 ^b	0.60±0.072 ^a	0.26±0.029 ^b

注:不同字母上标表示在同一时间不同饲料组间差异显著($P<0.05$),*表示在同一组40 d与80 d之间显著差异($P<0.05$)。
Notes: Different superscripts indicate significant differences between different feed groups at the same time ($P<0.05$), while * indicates significant differences between the same group at 40 and 80 days ($P<0.05$).



柱状图上方不同字母和“*”表示差异显著($P<0.05$)。
The different letters and “*” above the bar chart represent significant differences ($P<0.05$).

图2 不同投喂组罗非鱼肠道炎症基因相对表达量

Fig. 2 Relative expression of intestinal inflammatory genes of tilapia in different feeding groups

表8 罗非鱼肠道微生物 Alpha 多样性指数

Tab. 8 Alpha diversity index of intestinal microorganisms in tilapia

分组 Group	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
对照组 Ordinary group	1 171.43±128.14	1 169.92±129.22	0.94±0.02	6.08±0.64 ^a	1
蚕豆组 Faba bean group	644.96±335.84	642.90±337.40	0.84±0.09	4.70±0.36 ^b	1
脆化饲料组 Crisp feed group	1 193.35±617.24	1 191.20±616.77	0.96±0.05	6.83±2.14 ^a	1

注:同一列中具有不同上标者表示差异显著($P<0.05$)。
Notes: Different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$).

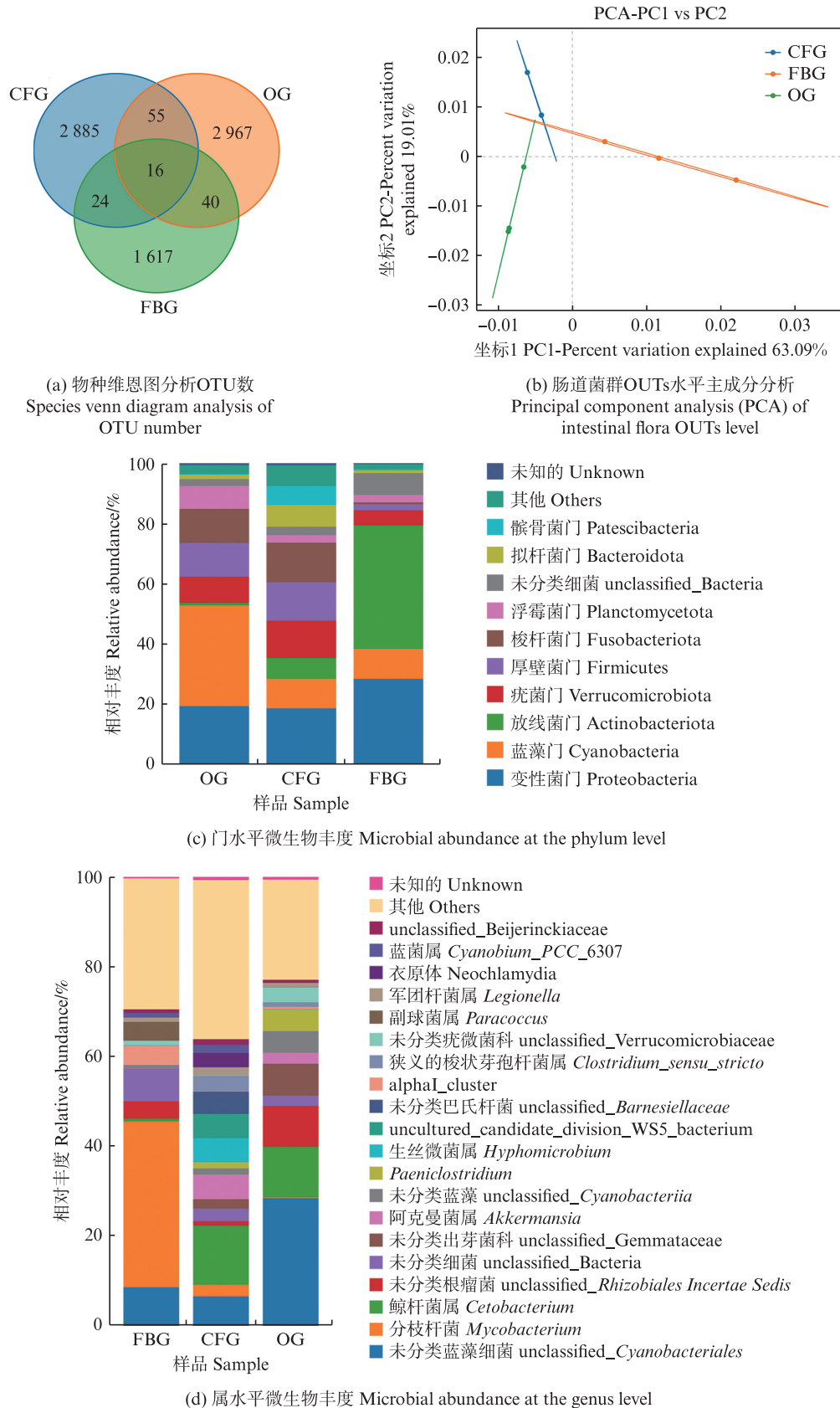


图3 肠道微生物物种组成分析

Fig. 3 Analysis of intestinal microbial species composition

表9 蚕豆组与对照组微生物物种丰度差异比较
Tab. 9 Comparison of microbial species abundance between faba bean group and ordinary group

门 Phylum	分组 Group	平均值±标准误 Mean±SE	P
绿弯菌门 Chloroflexi	FBG	0.001 42±0.000 55	<0.001
	OG	0.011 80±0.000 35	
Sumeriacota	FBG	0.000 01±0.000 01	<0.01
	OG	0.000 37±0.000 02	
蛭弧菌门 Bdellovibrionota	FBG	0.004 65±0.000 28	<0.05
	OG	0.001 77±0.000 42	
放线菌门 Actinobacteriota	FBG	0.397 75±0.070 60	<0.05
	OG	0.007 87±0.000 45	
厚壁菌门 Firmicutes	FBG	0.019 00±0.006 82	<0.05
	OG	0.112 35±0.018 48	
梭杆菌门 Fusobacteriota	FBG	0.006 96±0.002 75	<0.05
	OG	0.114 67±0.022 86	
热脱氯杆菌门 Desulfobacterota	FBG	0.000 27±0.000 16	<0.05
	OG	0.005 54±0.001 17	
蓝藻门 Cyanobacteria	FBG	0.098 11±0.017 41	<0.05
	OG	0.336 34±0.055 51	
浮霉菌门 Planctomycetota	FBG	0.025 74±0.007 54	<0.05
	OG	0.076 27±0.013 00	

注:结果以“平均值±标准误”表示, $P<0.05$ 认为差异显著。

Notes: The results are expressed as “Mean±SE”, and $P<0.05$ is considered significant.

表10 脆化饲料组与对照组微生物物种丰度差异比较
Tab. 10 Comparison of microbial species abundance between the crisp feed group and the ordinary group

门 Phylum	分组 Group	平均值±标准误 Mean±SE	P
蓝藻门 Cyanobacteria	OFG	0.098 21±0.034 83	<0.05
	OG	0.336 34±0.055 51	
浮霉菌门 Planctomycetota	OFG	0.024 71±0.009 66	<0.05
	OG	0.076 27±0.013 00	

注:结果以“平均值±标准误”表示, $P<0.05$ 认为差异显著。

Notes: The results are expressed as “Mean±SE”, and $P<0.05$ is considered significant.

3 讨论

3.1 脆化养殖对罗非鱼生长、血清生化及肠道健康影响的综合分析

生产中的脆化是通过投喂蚕豆或含蚕豆成分的饲料改变了鱼的生长和结构,这个过程中对血液和肠道影响主要是由蚕豆引起的,但值得注意的是蚕豆是初级农产品,其组分不稳定,且不同饲料组的营养成分不同,这些都会造成不同影响。

本研究主要探讨脆化养殖方式对罗非鱼的影响,如果深入研究不同饲料成分的作用效果应设计等氮等脂饲料实验。

本实验中,经80 d饲喂,蚕豆组和脆化饲料组的生长指标显著低于对照组。脆化养殖引起的生长性能降低和蚕豆营养不平衡,如淀粉含量高而蛋白、脂肪含量相对较低,且氨基酸组成不平衡^[13],与含有大量抗营养物质,如植酸盐、皂苷和蛋白酶抑制剂等^[14]有关。本研究以血清生化、肠道形态、紧密连接蛋白基因、消化酶活性、抗氧化酶活性、免疫炎症基因和菌群的变化多个指标综合分析肠道健康发现,肠道绒毛变短、抗氧化能力下降、免疫炎症反应、潜在有益菌丰度下降、潜在致病菌丰度增加等现象在两组中均存在,推测上述肠道健康异常状态也可能是脆化养殖抑制生长性能的原因。脆化饲料组生长性能介于其他两组之间,可能是由于在制作脆化饲料过程中,蚕豆经过脱皮、制粉、热处理等工艺后减少了部分抗营养物质,此外脆化饲料中其他谷物原料也可补充营养。绝大部分草鱼或罗非鱼脆化养殖研究均发现生长性能下降,这与本实验结果一致,但符兵等^[12]用自制的脆化饲料(15%、30%、60%)饲喂罗非鱼后发现生长性能无显著差异,可能是由于其所用的饲料营养更充分且均衡,也可能与养殖方式、水体、温度等环境不同有关,由此也说明脆化养殖对生长的抑制作用是可以改变的。

AST和ALT可作为肝脏损伤的标志物^[15]。本研究中和对照组相比,蚕豆组血清ALT和AST活性升高,脆化饲料组血清AST和ALT活性无显著变化,推测蚕豆投喂对罗非鱼肝功能造成损伤,而脆化饲料(约50%蚕豆)对肝功能无损伤。本研究发现蚕豆组和脆化饲料组中血清LYZ活性显著增加与LI等^[16]投喂罗非鱼脆化饲料(60%蚕豆)后肝脏LYZ活性无显著变化不同,可能是由于取样组织、脆化时间等不同。

与40 d比较,80 d时脆化饲料组体长、 α -淀粉酶、脂肪酶活性、绒毛长度和IL-10表达量显著变化,而除此之外的血清生化、抗氧化、绝大部分紧密连接蛋白、炎性基因表达等指标不变,说明整体而言脆化饲料饲喂40 d后,对肠道影响不会随饲喂时间延长明显改变。

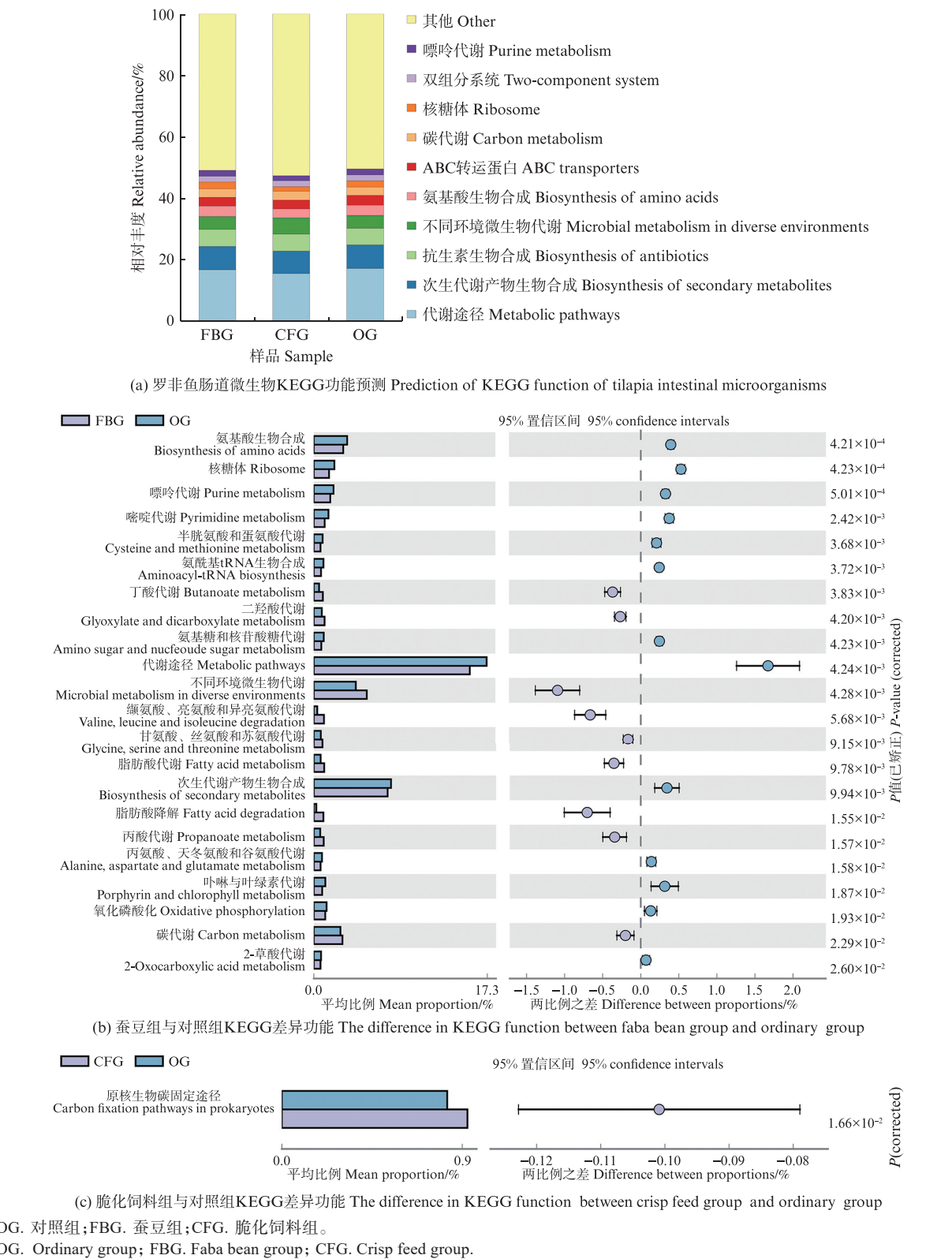


图 4 肠道微生物功能预测
Fig. 4 Prediction of intestinal microbial function

3.2 脆化养殖对罗非鱼肠道形态和细胞膜通透性的影响

本实验投喂蚕豆和脆化饲料后罗非鱼肠道

结构褶皱减少、肠绒毛稀疏和长度减短,与饲喂蚕豆和蚕豆各提取物(水提取物、醇提取物、蛋白提取物等)造成草鱼肠道绒毛脱落融合和黏膜皱

<http://www.shhydx.com>

膜稀疏^[3],饲喂脆化饲料造成罗非鱼肠道绒毛高度、宽度降低相类似^[12]。推测肠道的形态变化和蚕豆凝集素等抗营养物质有关,蚕豆凝集素能与肠表面结合,引起肠绒毛萎缩,破坏紧密连接蛋白,抑制上皮细胞增殖,诱导细胞凋亡^[17]。此外,80 d脆化饲料组肠绒毛长度比对照组降低,但比蚕豆组显著增加,说明脆化饲料组对肠道形态的影响小于蚕豆组。与40 d比较,80 d时的肠绒毛长度在对照组、脆化饲料组中增加,可能与个体生长引起的变化相关。

紧密连接蛋白是位于肠道上皮细胞间的一种多种蛋白质复合物,其表达水平可反映细胞膜通透性,维持适宜的细胞膜通透性是肠道动物抵御病原微生物和有害物质的机械屏障。紧密连接蛋白主要由跨膜蛋白(Occludin 和 Claudins)、支架蛋白(Zonula occludens)和连接黏附蛋白(Junctional adhesion molecule, JAM)组成^[18]。GU等^[19]发现大豆皂苷诱发大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肠炎,破坏紧密连接,Claudin-3、Claudin-4、Occludin、Tricellulin和ZO-1的基因表达下调。在脊椎动物中Claudin-12和15表达上调会破坏肠道屏障功能^[20]。本研究发现,蚕豆组肠道Occludin、ZO-3和Claudin-3基因相对表达量显著下降,Claudin-12上调,说明蚕豆组肠道组织细胞膜通透性增加,肠道机械屏障受到损伤,可能诱发肠炎等疾病。脆化饲料组肠道各紧密连接蛋白基因相对表达量无显著变化,说明脆化饲料对罗非鱼肠道通透性影响不显著。

3.3 脆化养殖对罗非鱼肠道消化酶的影响

和对照组相比,蚕豆组中 α -淀粉酶和脂肪酶活性显著下降,与蚕豆饲喂草鱼引起蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等消化酶活性下降^[2]结果一致,因为蚕豆淀粉中含有较大比例的抗性淀粉,具有较强的酶解抗性,单宁等抗营养物质也会抑制淀粉酶活性,这些原因可能造成淀粉酶活性下降^[21]。同时,蚕豆中脂肪含量低与脂肪酶显著下降有关。脆化饲料组中 α -淀粉酶活性无显著差异,脂肪酶仅在40 d显著下降,与脆化饲料(15%~60%蚕豆)对罗非鱼肠道消化酶活性无显著影响^[12]的研究结果基本一致,可能是由于脆化饲料中经过热处理等饲料工艺处理后有效提高了淀粉消化率。

3.4 脆化养殖对罗非鱼肠道抗氧化能力的影响

抗氧化能力对于生物体免受活性氧(ROS)损伤具有重要影响^[22]。T-AOC水平反应抗氧化系统功能状况,其大小反映机体抗氧化酶系统和非酶系统对ROS的应对能力和机体内自由基代谢情况。MDA含量反映机体脂质过氧化程度以及氧自由基的含量。蚕豆中含有促氧化剂vicine和convicine^[23],能把还原型谷胱甘肽氧化成氧化型谷胱甘肽,造成机体氧化损伤。本研究中,脆化饲料组中T-AOC显著下降,MDA含量有增加趋势,蚕豆组中T-AOC在40 d有下降趋势,MDA含量显著增加,说明脆化养殖对肠道造成氧化损伤。蚕豆组饲喂80 d时T-AOC趋势改变为增加,可能是为应对累积过多的ROS。

3.5 脆化养殖对罗非鱼肠道免疫炎症反应的影响

研究表明饲喂豆粕会使鲤(*Cyprinus carpio* L.)肠道微绒毛受损,促炎基因表达增加,抗炎基因表达降低^[24]。大豆 β -伴大豆球蛋白会诱发建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)炎症和氧化,导致肠道消化吸收障碍^[25]。本实验中,蚕豆组促炎基因(*IFN- γ* 和*TNF- α*)表达增加,抗炎基因(*TGF- β 1*和*IL-10*)表达降低,脆化饲料组促炎基因和抗炎基因表达都增加,且两组中血清非特异免疫因子LYZ活性显著增加,说明蚕豆和脆化饲料会引起免疫炎症反应,两组抗炎基因表达不同,可能是蚕豆破坏或抑制了免疫系统反应,使其不能产生更多抗炎因子调节炎症反应,脆化饲料组也会引起肠道炎症反应,但未破坏或抑制免疫系统,仍可调节炎症反应。

3.6 脆化养殖对罗非鱼肠道微生物的影响

Chao1和Ace指数能衡量物种丰富度,Shannon和Simpson指数用于衡量物种多样性^[26]。本研究中,蚕豆组微生物多样性显著降低,与张振男等^[9]用蚕豆饲喂草鱼后肠道微生物多样性降低的结果一致。而脆化饲料组多样性指数无显著差异,与秦志清^[11]和符兵等^[12]用脆化饲料饲喂罗非鱼后肠道微生物多样性降低的结果不同。变形菌门丰度在本研究蚕豆组和HE等^[27]研究中显示增加,与秦志清^[11]和符兵等^[12]研究结果不同。不同研究结果中菌群变化有差异,推测是因为肠道菌群易受养殖环境、时间等影响,且本研究增加蚕豆组比较,其与对照组差别较大也会影响显著性分析统计。变形菌门丰度

增加是微生态失调的标志,疾病的潜在诊断标准^[28]。其变化与营养和代谢紊乱有关,而单一蚕豆中营养成分不平衡。在代谢紊乱的肥胖患者的研究中发现厚壁菌门和拟杆菌门丰度比值增加,且在控制饮食热量后其比值减小,而在本研究中发现蚕豆组厚壁菌门与拟杆菌门丰度比值(2.40)较对照组(7.73)减小,说明其代谢可能紊乱。

食物中膳食纤维可以增加肠道厚壁菌门相对丰度^[29]。蚕豆中膳食纤维含量(3.1%)低于脆化饲料(10%)、对照组(10%),且蚕豆粗纤维主要存在外壳中,养殖中发现罗非鱼几乎不摄食外壳。本研究中蚕豆组厚壁菌门丰度减小可能是摄入膳食纤维量减小。厚壁菌门细菌有利于碳水化合物和脂质代谢,会引起肥胖症^[30]。厚壁菌门丰度下降可能是罗非鱼生长速度减慢的原因之一。蚕豆组(芽孢杆菌、乳酪杆菌等)和脆化饲料组(毛螺菌属、乳酪杆菌、考拉杆菌属等)多种益生菌显著下降,条件致病菌(分枝杆菌等)丰度增加。上述种群变化可能会引起免疫炎症反应。

肠道菌群基因功能预测,和对照组相比蚕豆组中氨基酸合成和代谢等下调可能是由单一蚕豆营养物质不足,蛋白质等代谢减弱引起,而丁酸和丙酸代谢,脂肪酸代谢和降解上调,可能与肠道炎症有关,其代谢产物短链脂肪酸对保护肠道屏障,降低炎症反应等有重要作用。脆化饲料组仅碳固定途径有显著差异,可能与脆化饲料组中自养型固碳细菌(uncultured_soil_bacterium等土壤细菌)丰度增加有关,其能将无机碳转化为有机碳,为宿主提供营养物质。

4 结论

综上所述,饲喂蚕豆或脆化饲料的脆化养殖方式都会对罗非鱼生长及肠道健康产生不利影响,如会抑制生长和肠道抗氧化能力,使肠道绒毛变短,引起炎症反应,厚壁菌门中有益菌丰度下降,变形菌门、分枝杆菌中潜在致病菌丰度增加。但脆化饲料对罗非鱼的不利影响弱于蚕豆,主要表现为脆化饲料对消化酶活性、肠道通透性、抗炎系统,微生物多样性和梭杆菌门丰度无显著影响,蚕豆对上述指标均有显著负面作用。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 符兵,彭凯,赵红霞,等. 鱼类脆化作用机理的研究进展[J]. 饲料研究, 2023, 46(3): 140-143.
FU B, PENG K, ZHAO H X, et al. Research progress on the mechanism of fish embrittlement [J]. Feed Research, 2023, 46(3): 140-143.
- [2] 李忠铭,冷向军,李小勤,等. 脆化草鱼生长性能、肌肉品质、血清生化指标和消化酶活性分析[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 186-189.
LI Z M, LENG X J, LI X Q, et al. The growth performance, muscle quality, serum biochemical indexes and digestive enzyme activity of crisp grass carp were analyzed [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(3): 186-189.
- [3] MA L L, KANEKO G, WANG X J, et al. Effects of four faba bean extracts on growth parameters, textural quality, oxidative responses, and gut characteristics in grass carp [J]. Aquaculture, 2020, 516: 734620.
- [4] 邝雪梅,张环,陈斌,等. 草鱼脆化前后肌肉营养成分及其红细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶含量的比较[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2004, 22(3): 258-261.
KUANG X M, ZHANG H, CHEN B, et al. Comparison on the content of the nutrient composition in grass carp's muscle and the Glucose-6-phosphodehydrogenase in its erythrocyte from the beginning to the end of making grass carp's meat crisp to the taste [J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2004, 22(3): 258-261.
- [5] CHEN L J, KANEKO G, LI Y C, et al. Reactive oxygen species (ROS)-mediated regulation of muscle texture in grass carp fed with dietary oxidants [J]. Aquaculture, 2021, 544: 737150.
- [6] YU E M, FU B, WANG G J, et al. Proteomic and metabolomic basis for improved textural quality in crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idella* C. et V) fed with a natural dietary pro-oxidant [J]. Food Chemistry, 2020, 325: 126906.
- [7] 陈论践,郁二蒙,王广军,等. 投喂蚕豆对草鱼免疫器官超微结构和免疫基因表达的影响[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(6): 92-103.
CHEN L J, YU E M, WANG G J, et al. Effects of feeding with broad bean on the immune organ ultrastructure and expression of immune genes of grass carp [J]. Journal of China Agricultural University, 2019, 24(6): 92-103.
- [8] 林科涛. 摄食蚕豆和普通饲料的草鱼肠道微生物的差异比较[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
LIN K T. Comparison of intestinal microbes between feeding broad bead and common feed in grass carps [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019.
- [9] 张振男,郁二蒙,谢骏,等. 不同脆化阶段草鱼肠道菌群动态变化、血清酶指标及生长性能[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 151-160.

- ZHANG Z N, YU E M, XIE J, et al. Intestinal microflora dynamic change, serum enzyme and growth performance of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) at different stages of feeding broad bean (*Vicia faba*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23 (2): 151-160.
- [10] LI Z F, YU E M, WANG G J, et al. Broad bean (*Vicia faba* L.) induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella* C. et V) by increasing relative abundances of intestinal gram-negative and flagellated bacteria [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1913.
- [11] 秦志清. 脆化饲料对罗非鱼生长性能、肌肉品质和肠道菌群的影响 [J]. 饲料研究, 2023, 46(21): 41-46.
- QIN Z Q. Effect of embrittlement feed on growth performance, muscle quality and intestinal microbiota of tilapia [J]. Feed Research, 2023, 46(21): 41-46.
- [12] 符兵, 彭凯, 陈冰, 等. 饲料中添加蚕豆对罗非鱼生长性能、肠道消化酶活性、肠道形态和肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(1): 494-504.
- FU B, PENG K, CHEN B, et al. Effects of faba bean supplementation on growth performance, intestinal digestive enzyme activities, intestinal morphology and intestinal flora of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(1): 494-504.
- [13] DHULL S B, KIDWAI M K, NOOR R, et al. A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. Legume Science, 2022, 4(3): e129.
- [14] LABBA I C M, FRØKJÆR H, SANDBERG A S. Nutritional and antinutritional composition of fava bean (*Vicia faba* L., var. minor) cultivars [J]. Food Research International, 2021, 140: 110038.
- [15] HUANG X J, CHOI Y K, IM H S, et al. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques [J]. Sensors, 2006, 6(7): 756-782.
- [16] LI Q Q, HUANG Y, XIE X, et al. Comparison of growth, and non-specific immune of crisp and ordinary tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2023, 562: 738827.
- [17] 刘佳伟, 赵进鹏, 鄂天姣, 等. 大豆凝集素诱导动物肠道损伤的抗营养机制的研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(6): 1295-1301.
- LIU J W, ZHAO J P, E T J, et al. Research progress on anti-nutritional mechanism of soybean agglutinin induced intestinal injury in animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(6): 1295-1301.
- [18] TAN H F, HU B, LIU W X, et al. Comprehensive analysis of the immunological differences in the intestinal barrier of improved grass carp and their parents [J]. Aquaculture, 2023, 577: 739931.
- [19] GU M, PAN S H, LI Q, et al. Protective effects of glutamine against soy saponins-induced enteritis, tight junction disruption, oxidative damage and autophagy in the intestine of *Scophthalmus maximus* L [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 114: 49-57.
- [20] LUO J B, FENG L, JIANG W D, et al. The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 197-207.
- [21] PUNIA S, DHULL S B, SANDHU K S, et al. Faba bean (*Vicia faba*) starch: structure, properties, and in vitro digestibility—a review [J]. Legume Science, 2019, 1(1): e18.
- [22] ZHU T Y, YANG R, XIAO R G, et al. Effects of flow velocity on the growth performance, antioxidant activity, immunity and intestinal health of Chinese Perch (*Siniperca chuatsi*) in recirculating aquaculture systems [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 138: 108811.
- [23] FU B, ZHENG M P, YANG H C, et al. The effect of broad bean diet on structure, flavor and taste of fresh grass carp: a comprehensive study using E-nose, E-tongue, TPA, HS-SPME-GC-MS and LC-MS [J]. Food Chemistry, 2024, 436: 137690.
- [24] URÁN P A, GONÇALVES A A, TAVERNE-THIELE J J, et al. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 751-760.
- [25] ZHANG J X, GUO L Y, FENG L, et al. Soybean β -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish [J]. PLoS One, 2014, 8(3): e58115.
- [26] CHEN H, PAN J F, WANG Y Z, et al. Growth, health status and gut microbiota of the scalloped spiny lobster (*Panulirus homarus*) at different salinities [J]. Aquaculture, 2023, 562: 738779.
- [27] HE X G, SHU H M, XU T, et al. Effects of broad bean diet on the growth performance, muscle characteristics, antioxidant capacity, and intestinal health of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Animals, 2023, 13(23): 3705.
- [28] 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.
- [29] SUN Y G, ZHANG S S, NIE Q X, et al. Gut firmicutes: relationship with dietary fiber and role in host homeostasis [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(33): 12073-12088.
- [30] STOJANOV S, BERLEC A, ŠTRUKELJ B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. Microorganisms, 2020, 8(11): 1715.

Effects of crisp culture on growth performance, serum biochemical indexes and intestinal health of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LUO Wenbin^{1,2,3}, ZHAO Yan^{1,2,3}, ZHENG Jia^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To evaluate the effects of crisp culture on the growth, serum biochemical indexes and intestinal health of tilapia, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (665±34) g were fed with faba bean, crisp feed (approximately 50% faba bean) and ordinary feed. The growth, serum biochemistry, intestinal tissue morphology, tight junction protein, digestive enzyme, antioxidant enzyme, inflammatory gene and intestinal flora of tilapia were investigated at 40 d and 80 d. The results showed that: The body mass/length and weight gain rate in the faba bean/crisp feed group were significantly lower than those in the ordinary feed group. The serum lysozyme (LYZ) in the faba bean group was significantly higher than that in the ordinary feed group. There was no significant difference in serum alkaline phosphatase (AKP) between the faba bean group and ordinary feed group. The serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) increased at 80 days in faba bean group. There was no significant difference in serum ALT, AST and AKP between the crisp feed group and ordinary feed group, whereas LYZ was significantly higher in the crisp feed group. The length of intestinal villi in the faba bean/crisp feed group was shorter than that in the ordinary feed group. The expressions of tight junction protein genes *Occludin*/*ZO-3*/*Claudin-3* decreased significantly and the expression of *Claudin-12* increased significantly in the faba bean group. There was no significant difference in the expressions of the above genes between the crisp feed group and ordinary feed group. The activities of α -amylase and lipase in faba bean group decreased, and the activity of lipase in crisped feed group decreased only at 40 d. The content of malondialdehyde (MDA) in faba bean group significantly increased, and the total antioxidant capacity (T-AOC) significantly increased at 80 d. There was no significant difference in MDA content between the crisp feed group and ordinary feed group, but T-AOC significantly decreased. The expressions of pro-inflammatory genes *IFN- γ* , *TNF- α* and anti-inflammatory gene *IgM* were significantly higher in the faba bean/crisp feed group than those in the ordinary feed group. The expressions of anti-inflammatory genes *TGF- β 1* and *IL-10* decreased in the faba bean group, but the *TGF- β 1* and *IL-10* significantly increased in crisp feed group. The ACE, Chao1, Simpson and Shannon indexes of intestinal microorganisms in the crisped feed group were close to those in the ordinary feed group but higher than those in the broad bean group. The abundance of *Lachnospiraceae* and *Lactobacillus* in the crisped feed group decreased, while the abundance of *Mycobacteria* and multiple *Clostridium* increased. The abundance of Firmicutes, Fusobacteria and *Cetobacterium* in the broad bean group decreased, whereas the abundance of Proteobacteria and *Mycobacteria* increased. Compared with 40 d, there were no significant changes in most indexes in the crisp feed group at 80 d. In conclusion, feeding tilapia with faba bean or crisp feed (approximately 50% faba bean) inhibited growth and intestinal antioxidant capacity, shortened intestinal villi, induced intestinal inflammatory reactions, reduced the abundance of beneficial bacteria and increased the abundance of pathogenic bacteria in the intestine. However, the adverse effects of crisp feed were weaker than those of faba bean. The crisp feed had no significant effect on intestinal digestive enzyme activity, cell membrane permeability and anti-inflammatory system. Faba bean had significant negative effects on the above indexes.

Key words: tilapia; faba bean; crisp; immunity; gut microbiota