

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15077

PHB 剂量和饲喂时间对中华绒螯蟹肝胰腺酶活力和肠道菌群多样性的影响

邓元告¹, 黄琼叶¹, 马灌楠¹, 王晓梅², 隋丽英¹

1. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学 海洋与环境学院, 天津 300457;

2. 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津农学院, 天津 300384

摘要: 在配合饲料中添加不同剂量聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)(0%、3%、5%和 10%PHB)并饲喂不同时长(1 d、6 d、15 d 和 21 d), 研究 PHB 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹肝胰腺生化组成、酶活力和肠道菌群多样性的影响。结果表明, PHB 对中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺粗蛋白、粗脂肪、可溶性蛋白含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和各种消化酶活力, 以及肠道菌群多样性均产生一定影响, 并且这种影响与饲料中 PHB 水平和饲喂时间有关。与对照组相比, 投喂第 1 天, 10%PHB 使 T-SOD、淀粉酶和脂肪酶活力显著提高($P<0.05$), 5%和 10% PHB 使肠道菌群丰富度指数(Rr)显著提高($P<0.05$)。投喂第 6 天, 10%PHB 使淀粉酶活力显著降低($P<0.05$), 3%和 5%PHB 使脂肪酶活力显著降低($P<0.05$), 所有剂量 PHB 的添加均使 Rr 显著升高($P<0.05$)。投喂第 15 天, 10%PHB 使 T-SOD 降低($P<0.05$), 5%和 10%PHB 使脂肪酶活力显著提高($P<0.05$), 所有剂量 PHB 的添加使淀粉酶活力显著降低($P<0.05$), 使 Rr 显著升高($P<0.05$)。投喂第 21 天, 所有剂量 PHB 的添加使 T-SOD、淀粉酶和胰蛋白酶活力显著降低($P<0.05$), 而且降低幅度随 PHB 添加量增加而加大; 10%PHB 添加显著降低 Rr($P<0.05$), 3%和 5%PHB 添加对 Rr 无显著影响($P>0.05$)。因此, 饲料中 PHB 剂量较低时, 可饲喂较长时间; PHB 剂量较高时, 应适当缩短饲喂时间。

关键词: 中华绒螯蟹; 聚羟基丁酸酯; 肝胰腺; 酶活力; 肠道菌群多样性

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0138-08

水产动物和养殖水体的微生物区系(microbiota)对宿主的健康和营养状况至关重要^[1], 健康而稳定的肠道微生态环境不仅能够提高动物免疫力, 还能通过分泌消化酶等促进矿物质和营养物质的消化吸收和代谢^[2]。益生元(prebiotics)是非消化性的饵料成分, 可被特殊的微生物所代谢, 对宿主的健康和生长产生有益影响^[3-4]。

聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸 β -羟基丁酸的聚合体, 它在动物肠道内可通过酶解或化学水解的方式, 降解为 β -羟基丁酸单体, 是具有应用潜力的益生元^[5-6]。研究

表明, 在饲料中添加 PHB 可促进欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[7]、西伯利亚鲟(*Acipenser Baerii*)^[8-9]和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的生长^[10]。在针对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的研究中, 本课题组发现采用经过 PHB 强化的轮虫和卤虫投喂蚤状幼体, 可显著促进蚤状幼体变态, 提高存活率和抵抗弧菌感染的能力^[11-12]。添加 PHB 的配合饲料可促进幼蟹的蜕皮和增重, 对于部分肝胰腺酶如总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶等的活力具有不同程度的影响^[13], 并指出 1%PHB 为最适饲料添加水平。然而作为

收稿日期: 2015-02-16; 修订日期: 2015-04-20.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31172427).

作者简介: 邓元告(1974-), 男, 硕士, 主要从事海洋生物学研究. E-mail: dengyuangao@tust.edu.cn

通信作者: 隋丽英, 教授, 博士生导师. Tel: 022-60600338; E-mail: suily@tust.edu.cn

有机酸释放物质,长期使用 PHB 对中华绒螯蟹是否造成胁迫及其与 PHB 添加水平的关系尚有待研究。

本研究通过饲喂不同 PHB 含量的饲料,探讨不同水平 PHB 对中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺生化组成、酶活力和肠道菌群多样性的影响和随时间变化的规律,旨在揭示 PHB 对中华绒螯蟹生理影响的作用和机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹幼蟹取自天津宁河七里海养殖基地。经过 1 周暂养后,挑选大小相近,肢体健全和活力好的幼蟹用于实验。幼蟹初始平均体重 6.23 g,平均甲壳长 2.49 cm,平均甲壳宽 2.13 cm。实验分为 4 组,每组 24 只蟹,分别投喂添加 0%(对照组)、3%、5%和 10%PHB 的饲料。将 PHB 颗粒(Goodfellow, UK)溶解于氯仿后,均匀喷洒在饲料表面,室温晾干备用。饲料为上海海洋大学研制的扣蟹专用饲料,主要饲料成分包括豆粕 40%、鱼粉 13%、面粉 26%、酵母粉 3%、鱼油 3%,以及少量多维、矿物质、氯化胆碱和磷酸二氢钙等。饲料粗蛋白含量为 34.26%,粗脂肪含量为 8.34%。

1.2 实验方法

1.2.1 养殖条件 幼蟹随机分配到塑料养殖箱内(每箱水体 8 L),为避免自相残杀,每个箱体用有机玻璃隔出 12 个独立空间(单位面积 110 cm²),每个空间放置 1 只幼蟹,每个实验组共 24 只幼蟹(养殖过程中每组有 2~3 只蟹死亡,但不影响取样)。每天上午和傍晚按 4%~5%幼蟹体重投喂饲料。每天换水 50%,清除粪便及残饵。实验用水为经过 1 周以上曝气的自来水,实验期间水温为 17~20℃,DO 7.5~9.0 mg/L,连续充气。

1.2.2 组织取样 分别于实验开始后的第 1、3、6、10、15 和 21 天进行取样,每个实验组每次取 3 只蟹(即 3 个重复)。在无菌条件下将蟹体解剖,取出肝胰腺并冷冻干燥,用于生化组分和酶活力的测定;小心取出胃肠道组织,去除粪便,置于

-20℃下冷冻保存,用于肠道菌群多样性分析。

1.2.3 肝胰腺生化组分测定 分别对第 3 天和第 10 天取样的肝胰腺组织进行粗蛋白和粗脂肪含量的测定。粗蛋白采用凯氏定氮法测定。粗脂肪采用 Folch 等^[14]的方法,用氯仿-甲醇混合液(2:1, V/V)过夜抽提。

1.2.4 肝胰腺酶活力测定 准确称取第 1、6、15 和 21 天的冻干肝胰腺组织约 0.05 g,加入 9.9 mL 生理盐水,冰浴下机械匀浆(3000 r/min, IKA T18),匀浆液在 14000 r/min 和 4℃下离心 20 min,上清液分装于 2 mL 离心管中,置于-20℃冰箱冷冻备用。可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,以牛血清白蛋白做标准曲线。酶活力均采用试剂盒(南京建成生物研究所)在 37℃条件下进行,各种酶活力单位定义如下:

胰蛋白酶:1 mg 蛋白质中含有的胰蛋白酶 1 min 使吸光度变化 0.003,即为 1 个酶活力单位;脂肪酶:1 g 组织蛋白与底物反应 1 min,每消耗 1 μmol 底物为一个酶活力单位;淀粉酶:1 mg 组织蛋白与底物作用 30 min,水解 10 mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位;T-SOD:1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位。

1.2.5 胃肠道细菌多样性分析 将胃肠道样本解冻后,用 DNA 提取试剂盒(天根)提取基因组 DNA。PCR 扩增引物为 38F-GC: 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCC GCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 534R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'^[15]。PCR 反应体系为:10 μL 10×reaction buffer (MgCl₂ free), 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 2.5 U Taq DNA 聚合酶,双向引物 0.5 μmol/L, 400 ng/μL BSA, 100 ng DNA 模板,加 PCR 水至 50 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 53℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 30 个循环;72℃延伸 10 min。使用 Bio-Rad DCodeTM 系统对扩增产物进行 DGGE,将 PCR 产物上样于变性梯度 45%~60%的变性凝胶孔内,变性凝胶浓度为 8%(W/V)。电泳 16 h,温度 60℃,电压 38 V。电泳结束后用 EB 染色 20 min。采用 Bio-Rad ChemiDoc MP 成像系统获得 DGGE 图

谱。采用 Quantity One 软件对图像进行量化分析。采用 Neighbor-joining 法构建系统进化树。DGGE 谱图中条带的丰富度和多样性用加权丰富度指数 (range-weighted richness, Rr) 表示, 即总条带数(N)的平方与变性梯度凝胶梯度差(Dg)的乘积^[16], $Rr=N^2 \times Dg$ 。

1.3 数据分析

数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。所有数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。首先进行 Levene's 方差齐性检验, 当不满足齐性方差时, 对数据进行反正弦转化处理。采用单因子方差分析(One way ANOVA)对实验结果进行分析, 用 Duncan 法进行多重比较($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异显著或差异极显著)。针对酶活力数据进行双因素重复实验的方差分析, 以确定 PHB 添加量、培养天数和两者的交互作用对该酶活力产生的显著影响。

2 结果与分析

2.1 肝胰腺生化组成

投喂不同 PHB 含量饲料第 3 天和第 10 天时, 中华绒螯蟹肝胰腺粗蛋白和粗脂肪含量如图 1 所示。随饲喂时间的延长, 肝胰腺粗蛋白含量从占干重的 24%~31%降低到 17%~23%, 第 3 天投喂 5%PHB 饲料组别显著低于 10%PHB 组($P < 0.05$), 第 10 天投喂 3%PHB 饲料组别显著低于 10%PHB 组($P < 0.05$)。随饲喂时间的延长, 肝胰腺粗脂肪含

量从占干重的 26%~36%增加到 50%~66%, 且随饲料中 PHB 水平的增加而有所下降, 第 10 天投喂 10%PHB 饲料组别显著低于对照组($P < 0.05$)。

投喂不同 PHB 含量饲料第 1、6、15 和 21 天时, 中华绒螯蟹肝胰腺可溶性蛋白含量见图 2。可溶性蛋白水平一般维持在 43~64 mg/g 干重, 且随 PHB 水平升高而升高, 第 6 天添加 5%PHB 和 10%PHB 组显著高于对照组和 3%PHB 组($P < 0.05$), 第 21 天添加 10%PHB 组显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 肝胰腺酶活力

投喂不同含量 PHB 饲料第 1、6、15 和 21 天时, 中华绒螯蟹肝胰腺 T-SOD、淀粉酶、胰蛋白酶和脂肪酶活力如图 3 所示。饲料中 PHB 添加量和饲喂时间对肝胰腺各种酶活力的影响不尽相同。投喂初期, 随 PHB 添加量增加, 肝胰腺 T-SOD 活力显著上升($P < 0.05$); 第 6 天各组无显著差异($P > 0.05$), 第 15 天 10%PHB 添加显著降低 T-SOD 活力($P < 0.05$); 第 21 天时所有添加 PHB 饲料组 T-SOD 活力均显著低于对照组($P < 0.05$)(图 3 A)。饲喂初期, 10%PHB 显著提高淀粉酶活力($P < 0.05$); 第 6 天时, 与对照组相比 10%PHB 显著降低淀粉酶活力($P < 0.05$); 而后随饲喂天数增加, 添加 PHB 均对淀粉酶活力产生显著抑制作用, 且随 PHB 添加量增加, 抑制作用越明显($P < 0.05$)(图 3 B)。饲喂前期, PHB 对胰蛋白酶活力无显著影响($P > 0.05$); 但第 21 天时, 添加 10%PHB 显著降低

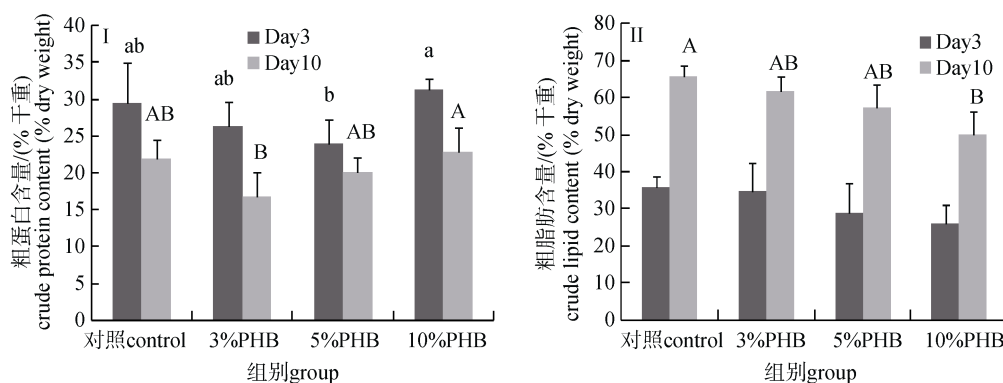


图 1 随 PHB 水平增加和饲喂时间延长中华绒螯蟹肝胰腺粗蛋白和粗脂肪含量变化

I. 粗蛋白; II. 粗脂肪。不同字母上标表示统计学上具有显著性差异($P < 0.05$)。

Fig.1 Change of hepatopancreatic crude protein and lipid content of *Eriocheir sinensis* with increasing dietary PHB level and feeding period
I. Crude protein; II. Crude lipid. Different letters represent significant difference at P level of 0.05.

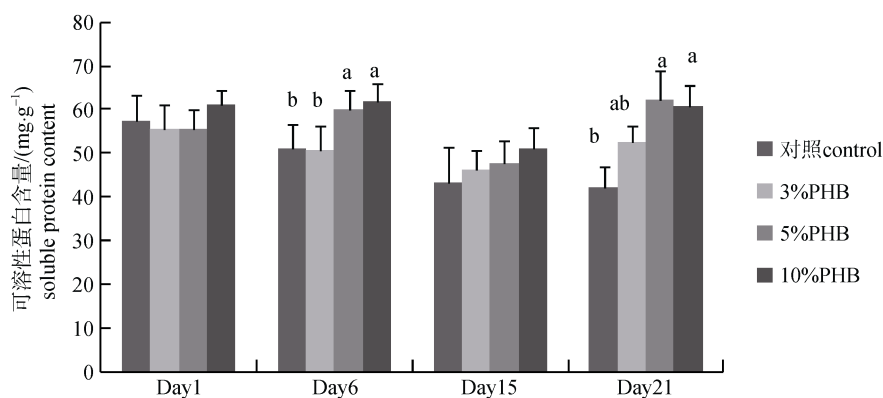


图 2 随 PHB 水平增加和饲喂时间延长中华绒螯蟹肝胰腺可溶性蛋白含量变化

同一取样时间不同字母上标表示统计学上具有显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 2 Change of soluble protein content of *Eriocheir sinensis* hepatopancreas with increasing dietary PHB level and feeding period. Different letters at certain sampling date represent significant difference at P level of 0.05.

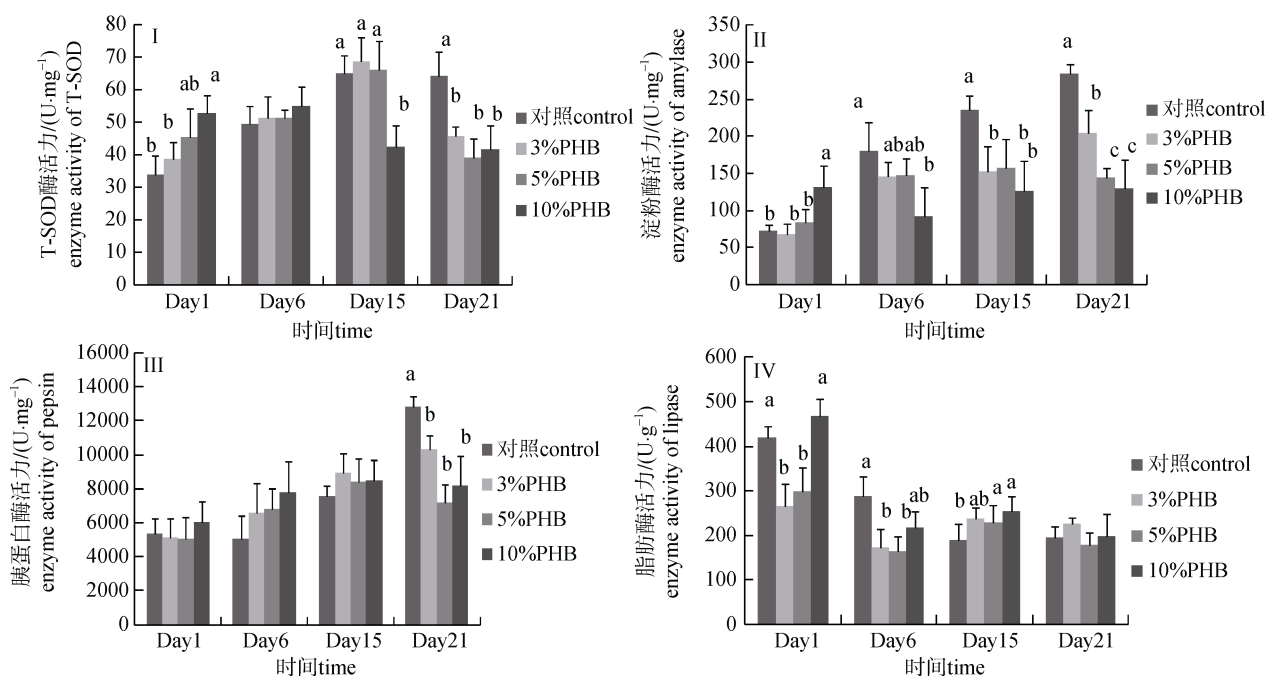


图 3 随 PHB 水平增加和饲喂时间延长中华绒螯蟹肝胰腺各种酶活力变化

I. T-SOD; II. 淀粉酶; III. 胰蛋白酶; IV. 脂肪酶. 同一取样时间不同字母上标表示统计学上具有显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 3 Change of enzyme activity of *Eriocheir sinensis* hepatopancreas with increasing dietary PHB level and feeding period

A. T-SOD; B. amylase; C. pepsin; D. lipase. Different letters at certain sampling date represent significant difference at P level of 0.05.

胰蛋白酶活力($P < 0.05$)(图 3 C)。饲喂第 1 天和第 6 天, 对照组和 10%PHB 组脂肪酶活力显著升高($P < 0.05$); 养殖后期这种显著性逐渐降低, 第 21 天时各组无显著差异($P > 0.05$)(图 3 D)。

针对上述结果的双因素方差分析结果见表 1。PHB 添加量对中华绒螯蟹肝胰腺可溶性蛋白、粗

蛋白和粗脂肪含量以及淀粉酶和脂肪酶活力的影响极为显著($P < 0.01$)。饲喂天数对肝胰腺粗蛋白和粗脂肪含量以及 T-SOD、淀粉酶、胰蛋白酶和脂肪酶活力均有极显著影响($P < 0.01$), 对可溶性蛋白含量则无显著影响($P > 0.05$)。PHB 添加量和饲喂天数二者交互作用对 T-SOD、淀粉酶、

表 1 双因素重复实验方差分析结果
Tab. 1 Two-factor repeated variance analysis on the experimental results

指标 indicator	PHB 添加量 PHB supplement	饲喂天数 feeding period	交互作用 interaction effect
粗蛋白 crude protein	**	**	
粗脂肪 crude lipid	**	**	*
可溶性蛋白 soluble protein	**		
总超氧化物歧化酶 T-SOD	*	**	**
淀粉酶 amylase	**	**	**
胰蛋白酶 pepsin		**	**
脂肪酶 lipase	**	**	**

注: * 表示具有显著影响($P<0.05$); ** 表示具有极显著影响($P<0.01$).
Note: * represents significant difference at P level of 0.05; ** represents extremely significant difference at P level of 0.01.

胰蛋白酶和脂肪酶活力有极显著影响($P<0.01$), 对粗脂肪含量影响较为显著($P<0.05$), 而对粗蛋白和可溶性蛋白含量则无显著影响($P>0.05$)。

2.3 胃肠道细菌菌群多样性

投喂不同 PHB 含量饲料第 1、6、15 和 21 天时, 中华绒螯蟹胃肠道细菌菌群加权丰富度指数(Rr)见表 2。第 1 天时投喂 5%和 10%PHB 组 Rr 比对照组显著提高($P<0.01$), 第 6 天和 15 天时所有添加 PHB 组 Rr 均比对照组显著提高($P<0.05$), 而第 21 天时投喂 3%和 5%PHB 组 Rr 与对照组无

显著差别, 但 10%PHB 组 Rr 最低($P<0.05$)。针对部分胃肠道细菌基因组 16S rDNA PCR-DGGE 条带的聚类分析见图 4。投喂 PHB 和不同饲喂时间对胃肠道细菌菌群相似度均产生影响。投喂 3%PHB 组, 第 1 天和 6 天菌群相似度为 72%, 第 15 天和 21 天菌群相似度为 92%, 前两者和后两者菌群相似度则为 56%(图 4A)。第 21 天, 投喂 0%和 3%PHB 胃肠道细菌菌群相似度为 84%, 5% PHB 与其相似度为 71%, 投喂 10% PHB 与前三者相似度为 58%(图 4B)。

表 2 随 PHB 水平和饲喂时间增加中华绒螯蟹胃肠道细菌菌群加权丰富度指数(Rr)
Tab. 2 Ranged-weighted richness (Rr) for gastrointestinal bacterial community of *Eriocheir sinensis* with increasing dietary PHB level and feeding period

PHB 添加量 PHB supplement	投喂时间/d feeding period			
	1	6	15	21
0%	12.48±3.72 ^c	13.4±4.60 ^b	13.20±3.55 ^b	17.51±2.19 ^{ab}
3%	19.33±4.40 ^c	27.86±6.00 ^a	32.55±3.45 ^a	23.00±10.13 ^a
5%	32.81±6.21 ^b	24.03±1.39 ^a	24.02±3.11 ^a	23.29±3.64 ^a
10%	46.86±3.82 ^a	23.17±1.51 ^a	24.08±7.16 ^a	10.37±2.93 ^b

注: 同列不同上标字母表示各 PHB 剂量组在统计学上具有显著($P<0.05$).
Note: Different superscript letters in the same column represent significant difference at P level of 0.05.

3 讨论

3.1 PHB 对肝胰腺粗蛋白、粗脂肪和可溶性蛋白含量的影响

肝胰腺是甲壳动物重要的酶分泌、营养物质吸收和储存以及卵黄生成(vitellogenesis)的中心^[17], 其营养组成(尤其是脂肪和脂肪酸)除了与动物生长发育和性成熟有关外, 还与饵料营养密切相关^[18]。

在间隔两周的养殖过程中, 中华绒螯蟹肝胰腺粗蛋白含量有所降低, 而粗脂肪含量显著升高, 应该与饲料和养殖环境的改变(从野外池塘转为室内养殖)有关。PHB 添加量的增加使肝胰腺粗蛋白和粗脂肪含量有所降低, 可能是由于 3%~10%PHB 在饲料中的添加导致饲料中粗蛋白和粗脂肪比例下降^[14]所致。
可溶性蛋白在生物体内作为酶和功能蛋白,

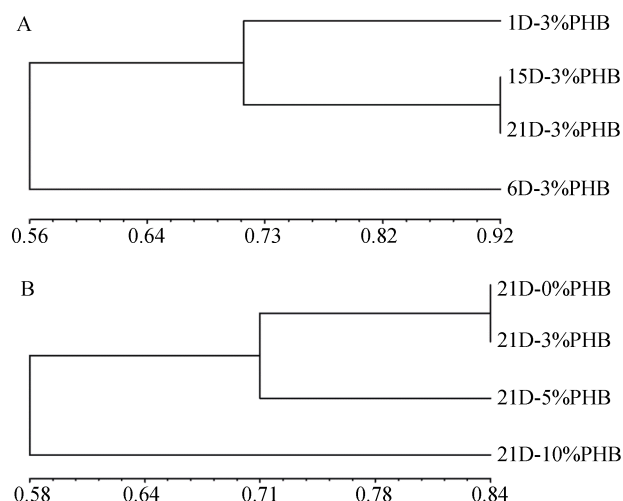


图 4 随 PHB 水平和饲喂时间增加中华绒螯蟹胃肠道细菌基因组 16S rDNA PCR-DGGE 条带聚类分析

A. 3%PHB 饲喂不同时长; B. 不同 PHB 添加量饲喂 21 天.

Fig. 4 Clustering analysis on 16S rDNA PCR-DGGE band of *Eriocheir sinensis* gastrointestinal tract with increasing dietary PHB level and feeding period

A. Feeding diets with 3% dietary PHB for different feeding period; B. Feeding diets with different PHB levels for 21 d.

在代谢调控和生理生化反应方面起重要作用。甲壳动物细胞内可溶性蛋白含量越高,生物体自我保护和调控能力、以及抗胁迫能力越强^[19]。本研究养殖中后期,饲料中添加 PHB 使肝胰腺可溶性蛋白水平相比对照组显著提高,表明 PHB 对幼蟹产生积极影响。

3.2 PHB 对肝胰腺 T-SOD 活力和各种消化酶活力的影响

肝胰腺酶类通常被用作衡量甲壳动物消化系统功能、性成熟和免疫活性的指标^[20-21]。超氧化物歧化酶(SOD)是底物诱导酶,生物体受到胁迫时 SOD 活力增强,以清除体内多余的自由基,可作为甲壳动物机体非特异性免疫指标^[22-23]。实验初期,肝胰腺 T-SOD 活力随 PHB 添加量增加而升高,表明 PHB 的添加对幼蟹抗氧化活力具有一定的促进作用。但较高剂量 PHB 和较长时间的饲喂则降低幼蟹的抗氧化能力^[16]。本研究中 PHB 添加量和饲喂时间对胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活力均有显著影响,但趋势有所不同。较高水平 PHB 和较长时间饲喂均降低淀粉酶和胰蛋白酶活力,不利于幼蟹对饵料淀粉和蛋白质的消化。这些酶

活力随 PHB 投喂剂量和投喂时间延长而降低的现象,可能与 PHB 在幼蟹胃肠道中降解产生 β -羟基酸单体,较低的肠道 pH 对幼蟹的生理机能产生胁迫而造成的。Najdegerami 等^[9]发现,经过 PHB 强化的卤虫对西伯利亚鲟鱼幼体消化道胰蛋白酶和脂肪酶没有显著影响,但显著降低淀粉酶活力。PHB 对同种消化酶活力影响的不同,可能与鱼类和甲壳类动物的物种差异以及发育阶段不同有关。

3.3 PHB 对胃肠道微生物菌群的影响

PHB 在水产动物肠道内可降解为短链脂肪酸 β -羟基丁酸单体^[5]。微酸性的肠道环境,有利于有益微生物(特别是革兰氏阳性细菌)在肠道中形成优势菌群。而健康的微生物菌群可分泌消化酶,在一定程度上促进营养物质的吸收和转化^[23]。加权丰富度指数(Rr)反映环境中菌群丰富度和环境的承载力^[17]。Rr 越大,表明菌群丰富度高、环境承载力大。本研究中,PHB 对 Rr 的影响呈现明显的剂量和饲喂时间的相关性,即 PHB 剂量越高, Rr 越早达到最高值; PHB 剂量越低, Rr 越迟达到最大值,而且较高剂量 PHB 和较长时间饲喂, Rr 有所降低,说明 PHB 的剂量和饲喂时间对肠道菌群丰富度和承载力具有显著调节作用。

甲壳类是蜕皮生长,包括壳长的增长和体重的增加。体重的增加主要是靠蜕皮时从介质中大量吸水。本课题组前期的研究发现, PHB 可显著促进溞状幼体和幼蟹的生长^[14-15],提高溞状幼体对弧菌的抵抗能力^[13]。在实验过程中由于幼蟹未蜕皮,因此无法对幼蟹的生长进行评估。

综上所述,饲料中添加一定量的 PHB 对中华绒螯蟹肝胰腺粗蛋白、粗脂肪、可溶性蛋白、T-SOD、各种消化酶活力和肠道微生物菌群丰富度均产生一定影响,并且这种影响与 PHB 水平和饲喂时间相关。因此作为饲料添加剂应用于水产养殖, PHB 水平较低时,可饲喂较长时间; PHB 水平较高时,应适当缩短饲喂时间。

致谢: 本实验所用中华绒螯蟹由天津市宁河县水产局吴健松高级工程师提供,实验所用饲料由上海海洋大学成永旭教授和吴旭干副教授提供,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Burr G, Gatlin D, Rickenbacker S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture[J]. J World Aquacult Soc, 2005, 36(4): 425–436.
- [2] Manning T S, Gibson G R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004, 18(2): 287–298.
- [3] Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotics[J]. J Nutr, 1995, 125(6): 1401–1412.
- [4] Qi Z Z, Zhang X M, Boon N, et al. Probiotics in aquaculture of China: Current state, problems and prospect[J]. Aquaculture, 2009, 290(1-2): 15–21.
- [5] Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P, et al. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 251–258.
- [6] Defoirdt T, Halet D, Vervareren H, et al. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*[J]. Environ Microbiol, 2007, 9(2): 445–452.
- [7] De Schryver P, Sinha A K, Kunwar P S, et al. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(5): 1535–1541.
- [8] Najdegerami E H, Tiet N T, Defoirdt T, et al. Effects of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 79(1): 25–33.
- [9] Najdegerami E H, Baruah K, Shiri A, et al. Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed *Artemia* nauplii enriched with poly- β -hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests[J]. Aquacult Res, 2015, 46(4): 801–812.
- [10] Nhan D T, Wille M, De Schryver P, et al. The effect of poly- β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2010, 302(1): 76–81.
- [11] Sui L Y, Cai J L, Sun H X, et al. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae challenged with pathogenic *Vibrio anguillarum*[J]. Fish Dis, 2012, 35(5): 359–364.
- [12] Sui L Y, Liu Y, Sun H X, et al. The effect of poly- β -hydroxybutyrate on the performance of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) zoea larvae[J]. Aquacult Res, 2014, 45(3): 558–565.
- [13] Liu Y, Sui L Y, Deng Y G, et al. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth and hepatopancreatic enzyme activities of *Eriocheir sinensis* juveniles[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1333–1338.[刘玉, 隋丽英, 邓元吉, 等. 聚羟基丁酸酯对中华绒螯蟹幼蟹生长和胰腺酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1333–1338.]
- [14] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1956, 226(1): 497–509.
- [15] Muyzer G E, De Waal C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695–700.
- [16] Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology[J]. Environ Microbiol, 2008, 10(6): 1571–1581.
- [17] Gibson R, Barker P L. 1979. The decapods hepatopancreas[J]. Oceanogr Mar Biol Annual Rev, 1979, 17: 285–346.
- [18] Sui L Y, Sun H X, Wu X G, et al. Effect of dietary HUFA on tissue fatty acid composition and reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock[J]. Aquacult Intl, 2011, 19(2): 269–282.
- [19] Kong X H, Zhang H X, Wang G Z, et al. Seasonal changes of soluble proteins and soluble saccharide in mud crab *Scylla serrata*[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science), 2008, 36(1): 99–102.[孔祥会, 张红绪, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹可溶性蛋白与可溶性糖的季节变化[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 36(1): 99–102.]
- [20] Ai C X, Chen L Q, Gao L J, et al. Effect of vitamin C on SOD, ALP and ACP activities of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2002, 21(4): 431–438.[艾春香, 陈立侨, 高露娇, 等. Vc 对河蟹血清和器官组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 431–438.]
- [21] Shan X, Xiao Z, Huang W, et al. Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles[J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 70–76.
- [22] Huang H Y, Li S J, Wang G Z. Studies on the crustacean phenoloxidase activity and its application[J]. Marine Science Bulletin, 2000, 19(5): 79–84.[黄辉洋, 李少菁, 王桂忠. 甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用[J]. 海洋通报, 2000, 19(5): 79–84.]
- [23] Yao C L, Wang Z Y, Xiang J H. Crustacean haemocytes and

their function in immune responses[J]. Journal of Zoological Research, 2006, 27(5): 549–557.[姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. 动物学研究, 2006, 27(5): 549–557.]

[24] Topping D L, Clifton P M. Short-chain fatty acids and human colonic function: role of resistant starch and non-starch polysaccharides[J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1031–1064.

Effect of dietary PHB dose and feeding duration on enzyme activities and gut microbial diversity in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

DENG Yuangao¹, HUANG Qiongye¹, MA Guannan¹, WANG Xiaomei², SUI Liying¹

1. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources & Chemistry, College of Marine and Environmental Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture, Tianjin Agriculture College, Tianjin 300384, China

Abstract: Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a microbial storage compound that occurs in the presence of excess carbon source. PHB is degraded into water-soluble β -hydroxybutyric acid in the gut of aquatic animals and slightly lowers gut pH. The acidic gut environment benefits growth of probiotic bacteria (particularly Gram-positive bacteria), which increases enzyme secretion and improves nutrient absorption and immunity of the animal. Dietary PHB benefits the growth and survival of marine fish and crustaceans, such as European seabass, *Dicentrarchus labrax*, Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, and giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Our previous studies indicated that PHB-enriched rotifers and *Artemia* nauplii significantly improve molting, survival, and tolerance to vibriosis challenge in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* zoeal larvae, and that PHB supplementation in formulated feed improves molting of juvenile *E. sinensis* at the optimal dietary level of 1% PHB. However, as PHB is an organic acid-releasing compound, little is known about its possible acidosis effect during long-term feeding or the interaction between feeding duration and dietary PHB level. In this study, the dosing and feeding period effects of dietary PHB on hepatopancreatic biochemical composition and enzyme activities, as well as intestinal microbial diversity in juvenile *E. sinensis*, were studied by feeding formulated diets containing 0%, 3%, 5%, and 10% PHB for 1, 6, 15, and 21 days, respectively. The results showed that dietary PHB supplementation affected crude protein content, crude lipid content, soluble protein content, and various hepatopancreatic digestive enzymes, as well as microbial diversity in the gastro-intestine, which were PHB-dose and feeding-period dependent. After 1 day of feeding, the 10% PHB supplemented group had significantly higher total superoxide dismutase (T-SOD) and hepatopancreatic amylase and lipase activities compared with those in the control group fed a diet containing no PHB ($P < 0.05$). In addition, 5% and 10% PHB resulted in significantly higher range-weighted richness (Rr) of the gastro-intestine microbial community ($P < 0.05$). After 6 days of feeding, the 10% PHB treatment resulted in significantly lower amylase activity and the 3% and 5% PHB treatments resulted in significantly lower lipase activity ($P < 0.05$). All PHB supplemented groups had significantly higher Rr values ($P < 0.05$). On day 15, the 10% PHB treatment resulted in significantly lower T-SOD, and the 5% and 10% PHB treatments resulted in significantly higher lipase activity ($P < 0.05$). All PHB supplemented groups had significantly lower amylase activity but higher Rr values ($P < 0.05$). On day 20, all PHB supplemented groups had significantly reduced T-SOD, amylase, and pepsin activities ($P < 0.05$); the higher the PHB dose, the greater the reduction. The 10% PHB group had a significantly reduced Rr value ($P < 0.05$), whereas 3% and 5% PHB had no effect on the Rr value ($P > 0.05$). These results suggest that a longer feeding period could be applied with a lower PHB dose and vice versa to support use of dietary PHB in cultured *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; poly- β -hydroxybutyrate; hepatopancreas; enzyme activity; intestinal bacterial diversity

Corresponding author: SUI Liying. E-mail: suily@tust.edu.cn