

读书报告

朱振祥

2018.11.25

题目

DOI: 10.1111/are.13669

ORIGINAL ARTICLE

WILEY



Evaluation of growth, feed utilization efficiency and immune parameters in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed diets supplemented with or diet fermented with gut bacterium *Bacillus* sp. DDKRC1. isolated from gut of Asian seabass (*Lates calcarifer*)

Debasis De¹  | Ramalingam Ananda Raja²  | Tapas Kumar Ghoshal¹ |

IF=1.475

目录

CONTENTS

① 简介

② 材料和方法

③ 结果与分析

④ 小结

The background features several overlapping, semi-transparent blue triangles and trapezoids that create a dynamic, layered effect. The colors range from a deep, dark blue to a very light, almost white blue. The shapes are oriented diagonally, creating a sense of movement and depth.

01

章节 PART

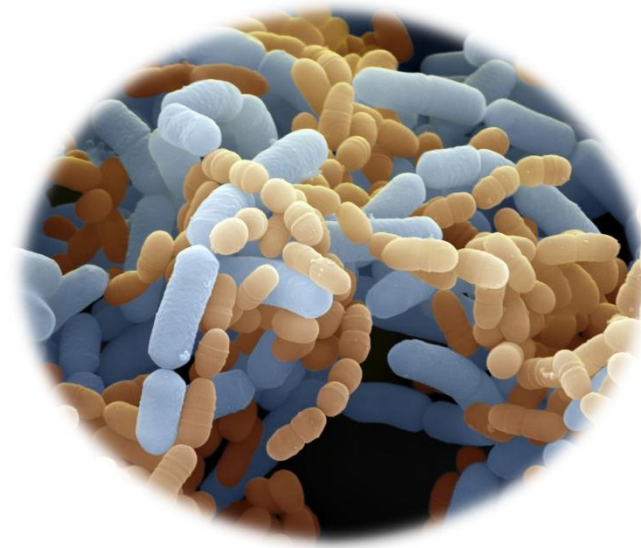
简介

01 简介

01 introduction

通过产酶促进宿主胃肠道消化和吸收能力。

通过定植和竞争粘附位点提高宿主的抵抗力。



竞争必需营养素，降低肠道pH值，产生病原体拮抗物。

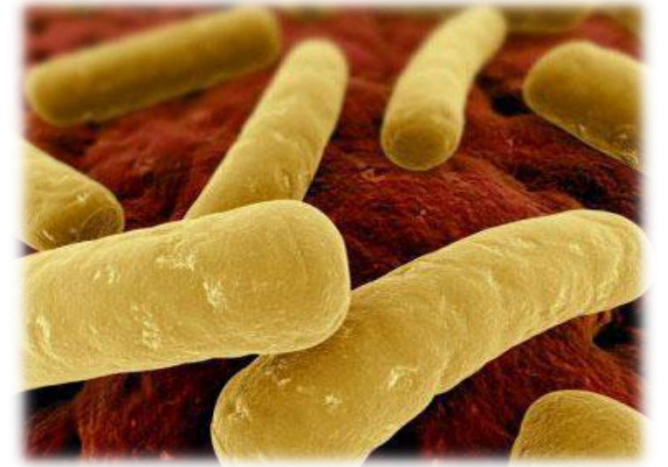
增强免疫反应和抗病性。

改善水生动物的酶活性，饲料消化率和饲料利用率，健康和生产性能。

01 简介

01 introduction

芽孢杆菌已被广泛用作潜在的益生菌，因为它们分泌多种抗微生物化合物和外酶。早期研究表明在很长一段时间里给予芽孢杆菌属。可以增强消化酶活性，通过激活免疫细胞活性来增强凡纳滨对虾（Gomez, Geovanny & Shen, 2008）和黑虎虾、斑节对虾的免疫防御能力（Rengpipat et al., 2000）。



没有统一的结论表明益生菌对任何鱼虾都有效果。数据表明来自陆生环境的益生菌或多或少的可以赋予鱼或虾益生效果，但从水生环境中的益生菌在用于任何水产养殖品种时都没有太大的优势（Zorriehzahra Mohammad等，2016）。

Lates calcarifer发现芽孢杆菌DDKRC1肠道是最有潜力的纤维素分解酶细菌（De, Ghoshal和Ananda Raja, 2014）。

02

章节 PART

材料和方法

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

TABLE 1 Proximate composition (% of dry weight) of the experimental diets

Parameters	Diets		
	D1	D2	D3
Moisture	8.87 ± 0.04	8.71 ± 0.11	12.20 ± 0.26
Crude protein	34.87 ± 0.03	34.59 ± 0.29	35.93 ± 0.14
Crude fibre	2.72 ± 0.06	2.74 ± 0.12	2.52 ± 0.07
Lipid	5.28 ± 0.07	5.28 ± 0.05	5.19 ± 0.05
Ash	12.07 ± 0.14	12.16 ± 0.03	12.78 ± 0.03
NFE	36.19 ± 0.05	36.52 ± 0.15	31.38 ± 0.08

D1 - control diet, D2- live bacterial-supplemented diet, D3 - fermented diet.

NFE, nitrogen-free extract; values are mean ± SD. Error of 3 determination.

芽孢杆菌DDKRC1：海鲈肠道中分离，16s rRNA测定
饲料制作：

D1：基础饲料

D2：基础饲料+ 2.94×10^5 cfu/g芽孢杆菌DDKRC1

D3：基础饲料+ 2.94×10^5 cfu/g芽孢杆菌DDKRC1（34°C
孵育48h）

饲料中除却维生素和氨基酸外，其他原料均与水混合后在灭菌锅中121°C灭菌5min。然后冷却后压制成型。芽孢杆菌则在灭菌冷却后加入。

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

养殖对象：健康斑节对虾

养殖时间：42d

投喂次数：2次

投喂量：10%

养殖水：50%的新鲜脱氯半咸

水，每3天换一次。

养殖条件：每组3个重复，每10天调整一次饲料量，喂食4小时后，将剩余的饲料收集干燥称重以计算喂食量。

TABLE 2 Water quality parameters in the rearing tanks during feeding trial

Water parameters	Measurements (mean \pm SD)		
	Group I	Group II	Group III
Dissolved oxygen (mg/L)	5.47 \pm 0.07	5.33 \pm 0.07	5.47 \pm 0.18
pH	7.84 \pm 0.03	7.94 \pm 0.04	7.85 \pm 0.03
Temperature $^{\circ}$ C	31.00 \pm 0.57	30.80 \pm 0.57	32.33 \pm 0.88
Salinity (g/L)	7.10 \pm 0.00	7.23 \pm 0.03	7.13 \pm 0.03
Alkalinity (mg/L)	130.67 \pm 1.33	136.00 \pm 2.31	129.33 \pm 0.53
Nitrate-(N) (mg/L)	0.181 \pm 0.02	0.163 \pm 0.01	0.151 \pm 0.02
Nitrite-(N) (mg/L)	0.027 \pm 0.007	0.028 \pm 0.009	0.024 \pm 0.006
Total Ammonia (mg/L)	0.378 \pm 0.012	0.326 \pm 0.022	0.366 \pm 0.011
Total microbial count ($\times 10^4$ cfu/ml)*	2.51 \pm 0.03 ^a	2.87 \pm 0.03 ^c	2.67 \pm 0.02 ^b
Total <i>Vibrio</i> count ($\times 10^2$ cfu/ml)*	1.15 \pm 0.02 ^b	0.88 \pm 0.04 ^a	1.12 \pm 0.02 ^b

Group I: fed diet D1, Group II: fed diet D2 and Group III: fed diet D3.

Values bearing different superscript letters (a,b,c) in a row differ significantly.

* $p < .05$.

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

样品采集，化学分析

增重率（%），特定增长率（SGR），饵料系数（FCR）和蛋白质效率比（PER）使用饲料标准方法（Steffens, 1989）测定。

营养素的表观消化率系数（ADC）根据（De Silva & Anderson, 1995）计算，公式为：

$$\text{Digestibility coefficient (\%)} = 100 - \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ in diet}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ in faeces}} \times \frac{\% \text{nutrient in faeces}}{\% \text{nutrient in diet}} \times 100$$

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

肠道微生物分析

将虾在冰盘上解剖，取出整条肠道（GI），在无菌条件下，加入用5倍体积的无菌冷冻磷酸盐缓冲盐水和0.9% NaCl进行匀浆。然后连续稀释10倍，分别取0.1毫升在羧甲基纤维素培养基和蛋白胨明胶培养基中进行培养，分别为一式两份，在30°C下孵育48小时后进行纤维素分解，淀粉分解和蛋白水解细菌的计数。以便计算样品体积的肠匀浆的菌落数。

消化酶测定

解剖取出每个实验组的虾和胃肠道进行匀浆，然后在4°C下以10,621g离心1小时，收集上清液用于酶活测定。分别测定：

1. 纤维素酶活性：使用1%羧甲基纤维素作为底物在柠檬酸盐缓冲液中的反应进行测定。
2. 淀粉酶活性：使用1%可溶性淀粉作为底物在磷酸盐缓冲液中的反应进行测定。
3. 蛋白酶活性：使用0.5%酪蛋白作为底物在Tris-HCl缓冲液中的反应进行测定。

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

总血细胞计数

每个重复随机取5只虾，使用含有等量的固定剂（10%福尔马林）的注射器在虾的第一腹部吸取血液。然后取20 μ l固定的血细胞悬浮液与相同体积的玫瑰红溶液（1.2%玫瑰红在50%乙醇）混合于离心管中，并在环境温度（27-35 $^{\circ}$ C）下孵育20分钟，然后在血细胞计数板中确定总血细胞计数（THC）。

颗粒状和非颗粒状血细胞计数

使用玫瑰红染色的血细胞悬浮液制备涂片。涂片使用苏木精溶液复染7-10分钟。然后用自来水冲洗10分钟后进行梯度酒精脱水，二甲苯澄清后封片。

颗粒细胞的计算为：记录200个总血细胞中大颗粒和小颗粒/半颗粒血细胞数。

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

酚氧化酶活性

使用分光光度计法测定血清的酚氧化酶（PO）活性：酚氧化酶与L-二羟基苯丙氨酸（L-DOPA）形成多巴色素。首先使用0.1M磷酸盐中制备成0.01M的L-DOPA缓冲液，然后将100微升血清和100 μ L-DOPA加入到含有3ml磷酸盐缓冲液的比色皿中。混匀后，在490nm处每隔2分钟进行OD值的测量，共60分钟。

总血淋巴蛋白也使用分光光度法测定，但使用牛血清白蛋白作为标准蛋白。

抗菌活性

将*Vibrio mimicus*的培养物，4800g离心15分钟，用0.1M磷酸盐缓冲液悬浮。将细菌悬浮液与血浆混合在570nm处测量其OD值，然后重新在37°C水浴中30分钟，冰浴10分钟停止反应后再次测量其OD值。

02 材料和方法

02 MATERIALS AND METHODS

吞噬活性测定

使用磷酸盐缓冲液制备酵母的悬浮液，取0.1ml该溶液与0.1ml血液混合，然后25°C水浴30分钟并每隔10分钟摇动一次。孵育结束后，取50 μ l制作涂片。风干涂片用甲醇固定3分钟，用抗凝血剂溶液洗涤载玻片以除去未粘附的血细胞并在空气中干燥，然后用Giemsa染液染色5分钟。在显微镜下计数吞噬细胞数。

血液中微生物数量

在实验结束时，总微生物计数（TPC）和总弧菌技术通过使用无菌TSA和TCBS琼脂平板的连续稀释扩散板法估计血淋巴中的计数。

The background features several overlapping, semi-transparent blue triangles of varying shades, creating a dynamic, geometric pattern. The colors range from a deep, dark blue to a light, airy sky blue. The triangles are arranged in a way that they appear to radiate from the bottom-left corner, filling the frame with a sense of movement and depth.

03

章节 PART

结果与分析

03 结果和分析

03 RESULTS

TABLE 1 Proximate composition (% of dry weight) of the experimental diets

Parameters	Diets		
	D1	D2	D3
Moisture	8.87 ± 0.04	8.71 ± 0.11	12.20 ± 0.26
Crude protein	34.87 ± 0.03	34.59 ± 0.29	35.93 ± 0.14
Crude fibre	2.72 ± 0.06	2.74 ± 0.12	2.52 ± 0.07
Lipid	5.28 ± 0.07	5.28 ± 0.05	5.19 ± 0.05
Ash	12.07 ± 0.14	12.16 ± 0.03	12.78 ± 0.03
NFE	36.19 ± 0.05	36.52 ± 0.15	31.38 ± 0.08

D1 - control diet, D2- live bacterial-supplemented diet, D3 - fermented diet.

NFE, nitrogen-free extract; values are mean ± SD. Error of 3 determination.

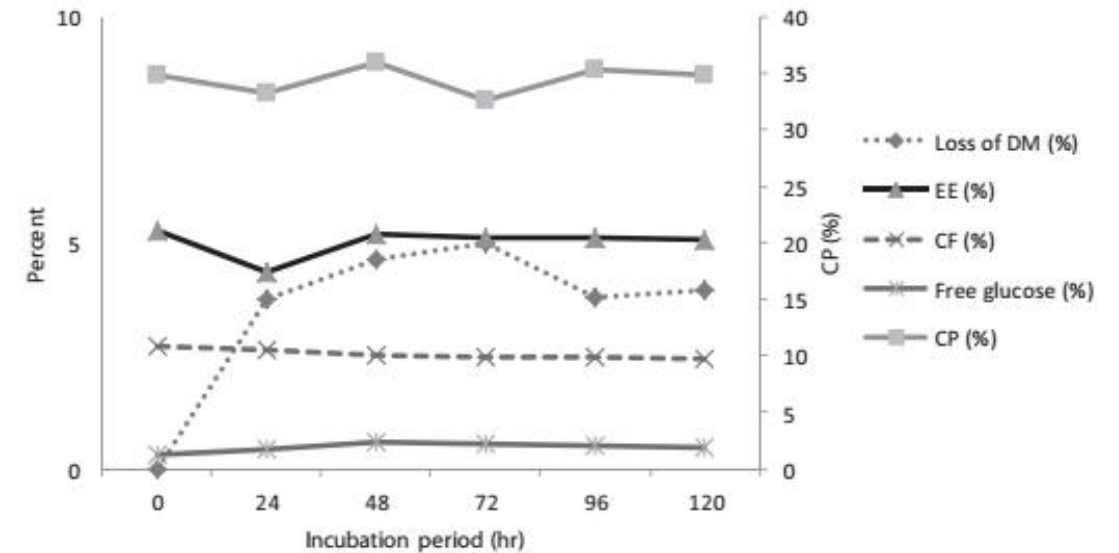


FIGURE 1 Change in nutrient content of diet after different hours of fermentation with *Bacillus sp.* DDKRC1.

饮食是等氮的（35%粗蛋白质）。粗纤维，脂质和灰分含量没有显著差异（ $p > 0.05$ ）。为了制备饮食D3，优化了发酵条件，并且发现在48小时后，pH值为5.81时，粗蛋白（CP）含量，游离葡萄糖浓度和微生物(EE)数量最大，干物质损失较少。随着发酵的进行，粗纤维（CF）含量降低。因此，可以得出结论，培养48小时是最佳的。

03 结果和分析

03 RESULTS

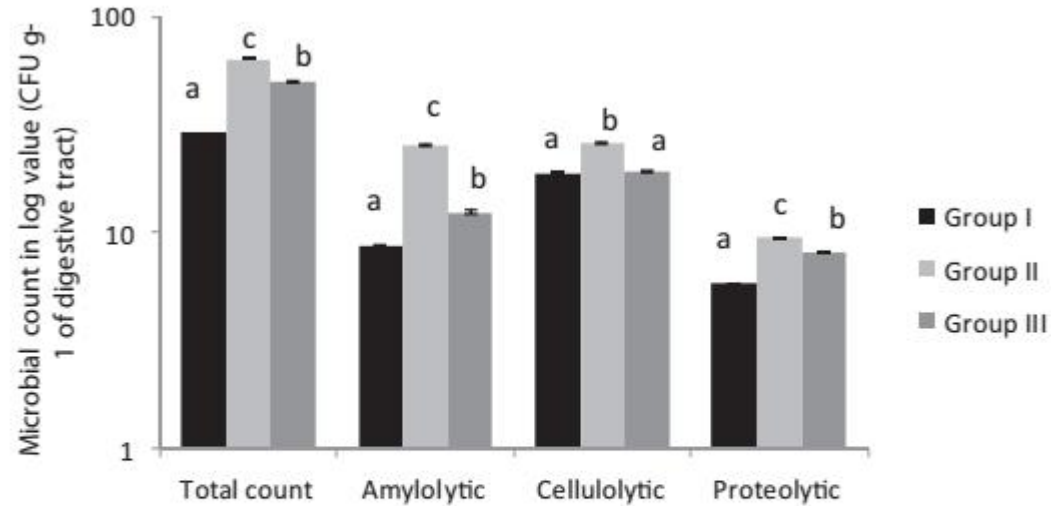


FIGURE 2 Microbial count in digestive tract of *P. monodon* fed experimental diets for 42 days. Mean values of different groups are significantly different ($p < .01$)

TABLE 3 Growth performance of *P. monodon*-fed experimental diets

Parameters	Treatment groups		
	Group I	Group II	Group III
Initial body wt. (g)	2.73 ± 0.003	2.73 ± 0.01	2.73 ± 0.04
Final body wt. (g)**	6.10 ± 0.01 ^a	6.52 ± 0.03 ^c	6.33 ± 0.02 ^b
Total wt. gain (g)**	3.37 ± 0.02 ^a	3.79 ± 0.02 ^c	3.60 ± 0.04 ^b
ADG (mg/d)**	80.15 ± 0.48 ^a	90.23 ± 0.63 ^c	85.71 ± 1.03 ^b
Weight gain (%)**	123.17 ± 0.88 ^a	138.48 ± 0.79 ^b	131.96 ± 3.46 ^b
DM intake (g/d)**	0.1517 ± 0.00 ^b	0.1486 ± 0.00 ^a	0.1536 ± 0.00 ^c
FCR **	1.89 ± 0.00 ^c	1.64 ± 0.00 ^a	1.78 ± 0.02 ^b
SGR (%)	1.91 ± 0.008	1.99 ± 0.07	2.00 ± 0.03
PER**	1.47 ± 0.00 ^a	1.75 ± 0.01 ^c	1.60 ± 0.01 ^b
Survival (%)*	70.83 ± 4.16 ^a	87.50 ± 0.00 ^b	83.33 ± 4.16 ^b

Group I: fed diet D1, Group II: fed diet D2 and Group III: fed diet D3. Values bearing different superscript letters (a,b,c) in a row differ significantly.

* $p < .05$.

** $p < .01$.

03 结果和分析

03 RESULTS

营养素表观消化率与肠道酶活性

Digestibility (%)	Treatment groups		
	Group I	Group II	Group III
Digestibility (%)			
Dry matter**	85.01 ± 0.10 ^a	87.37 ± 0.20 ^b	85.41 ± 0.20 ^a
Organic matter**	87.69 ± 0.08 ^a	90.05 ± 0.16 ^b	87.39 ± 0.17 ^a
Hemicellulose**	87.25 ± 0.80 ^a	90.03 ± 0.10 ^c	88.54 ± 0.08 ^b
Cellulose**	69.79 ± 0.63 ^a	77.27 ± 0.08 ^c	75.54 ± 0.37 ^b
Crude protein **	88.27 ± 0.08 ^a	90.62 ± 0.15 ^b	92.52 ± 0.10 ^c
Lipid**	91.94 ± 0.05 ^a	95.81 ± 0.06 ^b	92.19 ± 0.10 ^a
Gut enzyme activity			
Specific Amylase activity ^{**x}	85.87 ± 0.12 ^a	93.48 ± 0.69 ^b	86.40 ± 0.09 ^a
Specific Cellulase activity ^{**y}	38.52 ± 0.17 ^a	40.68 ± 0.74 ^b	38.92 ± 0.24 ^{ab}
Specific Protease activity ^{**z}	3.73 ± 0.15 ^a	4.98 ± 0.15 ^b	3.99 ± 0.08 ^a

03 结果和分析

03 RESULTS

TABLE 5 Carcass composition (% of dry weight) of *P. monodon*-fed experimental diets

Parameter	Treatment groups		
	Group I	Group II	Group III
Crude protein**	62.19 ± 0.09 ^a	65.61 ± 0.14 ^b	62.27 ± 0.06 ^a
Crude fibre**	9.62 ± 0.06 ^b	9.28 ± 0.07 ^a	9.44 ± 0.21 ^a
Ether extract**	2.80 ± 0.06 ^a	3.39 ± 0.04 ^c	3.06 ± 0.04 ^b
Ash**	16.39 ± 0.11 ^b	16.14 ± 0.05 ^b	14.43 ± 0.07 ^a

Group I: fed diet D1, Group II: fed diet D2 and Group III: fed diet D3. Values bearing different superscript letters (a,b) in a row differ significantly.

** $p < .01$.

TABLE 6 Haematological parameters of *P. monodon*-fed experimental diets

Parameter	Treatment groups		
	Group I	Group II	Group III
THC/ml of haemolymph ($\times 10^6$)*	13.90 ± 0.06 ^a	17.40 ± 0.35 ^b	17.90 ± 0.17 ^b
GH count/ml of haemolymph ($\times 10^6$)*	2.64 ± 0.09 ^a	4.28 ± 0.29 ^b	2.96 ± 0.18 ^{ab}
NGH count/ml of haemolymph ($\times 10^6$)*	11.26 ± 0.03 ^a	13.13 ± 0.06 ^b	14.94 ± 0.01 ^c
Serum PO activity U/min./mg protein	0.29 ± 0.01 ^a	0.53 ± 0.01 ^b	0.66 ± 0.03 ^c
Antibacterial activity	0.06 ± 0.00 ^a	0.14 ± 0.00 ^c	0.11 ± 0.00 ^b
Phagocytic activity (%)	17.75 ± 0.43 ^a	25.75 ± 0.14 ^c	23.75 ± 0.14 ^b
Total microbial count in haemolymph (cfu/ml $\times 10^3$)*	2.11 ± 0.00 ^b	1.52 ± 0.03 ^a	1.57 ± 0.02 ^a
Total <i>Vibrio</i> count in haemolymph (cfu/ml)	<30	<30	<30

Values bearing different superscript letters (a,b,c) in a row differ significantly.

* $p < .05$.



04

章节 PART

小结

04 小结

04 CONCLUSION

斑节对虾的饲料中加入芽孢杆菌属DDKRC1（JN641289）与基础组饲料相比，对生长，消化率，FCR，存活率和生长率以及免疫反应都有较好的影响。针对斑节对虾的FCR，PER和肠道消化酶活性饲料中加入活芽孢杆菌DDKRC1，比用其发酵的饮食有更好的效果。本研究结果对于咸水养殖饲料益生菌的开发具有实际意义。



THANK YOU

请各位老师同学批评指正!