

DOI: 10.12264/JFSC2024-0222

高碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾生长和肠道健康的影响

陈璐茜¹, 金怡婷¹, 伍宜杰¹, 孙盛明^{1, 2}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为深入探究碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)生长繁殖和肠道健康的影响, 以(2.85±0.12) g 罗氏沼虾幼虾为研究对象, 首先进行碳酸盐碱度急性胁迫实验, 得出 96 h 半致死浓度(LC₅₀), 在此基础上设置 1.5 (对照组)、3、6 和 9 mmol/L 4 个碳酸盐碱度处理组, 分别命名为 C1、C3、C6 和 C9 组, 进行为期 56 d 的碳酸盐碱度慢性胁迫实验。结果显示, 罗氏沼虾幼虾碳酸盐碱度 96 h LC₅₀ 值为 17.955 mmol/L, 安全浓度为 5.118 mmol/L。各实验组间幼虾成活率、增重率、特定生长率随碳酸盐浓度的升高而降低, 均在 C9 组显著低于其他实验组($P<0.05$); 但是 C9 组饲料系数显著高于其他 3 个实验组($P<0.05$)。与对照组相比, C3 组碳酸盐碱度对成虾的抱卵率和孵化率影响不显著($P>0.05$), 但 C6 与 C9 组繁殖能力则被显著抑制($P<0.05$)。透射电镜检测结果表明, 罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛结构脱落程度随碳酸盐碱度胁迫程度的升高而加剧, 且在 C9 组中损伤最大。围食膜形态观察结果表明, 实验组罗氏沼虾幼虾肠道围食膜结构随碳酸盐碱度胁迫程度的升高而发生破损, 扫描电镜可观察到高碳酸盐碱胁迫下的 C9 组罗氏沼虾围食膜孔隙增大。通过对罗氏沼虾幼虾肠道菌群 Alpha 多样性分析表明, 各组间肠道样品多样性指数差异均不显著($P>0.05$)。在门水平上, 各组样品中幼虾肠道的优势菌构成多以变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Plantomycetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)为主。在高碳酸盐碱度胁迫下, C9 组罗氏沼虾肠道内部分致病菌[如黄杆菌属(*Flavobacterium*) and 假单胞菌属(*Pseudomonas*)]丰度明显高于对照组。研究结果提示, 罗氏沼虾幼虾具有一定的碳酸盐碱度耐受性, 但高碳酸盐碱度慢性胁迫会导致罗氏沼虾幼虾的生长性能、抱卵率和孵化率受到显著抑制, 造成其肠道结构受损和肠道菌群结构改变, 进而增加盐碱水养殖罗氏沼虾幼虾疾病暴发风险。

关键词: 罗氏沼虾; 碳酸盐碱度; 生长; 围食膜; 肠道菌群; 盐碱水

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2024)08–0926–14

盐碱水一般指矿化度为 1000~50000 mg/L 的一种特殊的水体, 不同于海水和淡水, 具有较高的碳酸盐碱度, 其离子成分复杂、类型多样, 由于人畜无法饮用, 农业无法直接利用, 绝大多数处于闲置状态^[1]。我国是盐碱水资源大国, 现有约 6.9 亿亩的低洼盐碱水域^[2], 随着可利用的内陆水资源不断减少, 如何开发利用长期闲置的盐碱水域资源无疑成为拓展水产养殖空间有效措施。天

然水域中的总碱度主要由 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 构成, 因此碳酸盐碱度是衡量水体碱度的一个重要指标^[3]。周凯等^[4]、么宗利等^[5]、柳飞等^[6]发现高碳酸盐碱度抑制水产动物生长存活和繁殖代谢, 而驯养耐受高碳酸盐碱度的水产动物无疑是高效利用盐碱水养殖模式研究热点^[7]。2020 年农业农村部实施水产绿色健康养殖“五大行动”中明确提出, 因地制宜示范推广盐碱地水产养殖模式, 为盐碱水渔

收稿日期: 2024-07-04; 修订日期: 2024-08-01.

基金项目: 国家重点研发计划项目战略性科技创新合作专项(2023YFE0205100); 上海市教委东方学者特聘教授项目(TP2022078); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2022ZDYF0569); 上海市科技创新行动计划项目(23XD1421600, 22015820700).

作者简介: 陈璐茜(2000–), 女, 硕士研究生, 研究方向为甲壳动物逆境生理与抗逆育种. E-mail: 3011656306@qq.com

通信作者: 孙盛明, 教授, 博士生导师, 研究方向为甲壳动物逆境生理. E-mail: smsun@shou.edu.cn

业产业的发展提供了政策依据^[8]。因此, 探讨水产动物盐碱胁迫生理响应机制对于开发利用盐碱水渔业资源具有重要意义。

近年来, 关于盐碱水养殖经济水产动物的研究已有大量报道, 如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[9]、方正银鲫(*Carassius auratus*)^[10]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[11]、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)^[12]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[13]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[14]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosa*)^[15]等, 但关于罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)盐碱胁迫生理响应研究尚未见详细报道。罗氏沼虾是经济价值较高的淡水虾类之一, 其幼体阶段在海水中度过, 可耐受一定范围的盐碱度^[16], 由此罗氏沼虾作为盐碱水域养殖的经济虾类已有研究报道^[17-19]。肠道是虾类消化和吸收营养物质的主要场所, 肠道健康是保障虾类正常生长繁育的重要因素^[20-21], 但迄今为止, 针对碳酸盐碱度胁迫对虾类肠道健康的影响研究较为匮乏。

本研究首先分析不同浓度碳酸盐碱度对罗氏沼虾幼虾的毒性作用, 并以此确定幼虾的碳酸盐碱度半致死浓度, 随后观察碳酸盐碱度慢性胁迫下罗氏沼虾的生长与繁殖情况, 辅以肠道微绒毛结构、围食膜结构和肠道菌群结构变化数据, 从而了解碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾生长和肠道健康的影响, 旨在为碳酸盐型盐碱水域养殖罗氏沼虾提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用罗氏沼虾幼虾采购于海南汇鑫苗种有限公司, 挑选规格一致、健康活泼的幼虾作为实验虾, 平均体重(2.85 ± 0.12) g, 正式实验前先在室内控温循环水养殖玻璃缸(80 cm×60 cm×50 cm)暂养14 d。暂养期间每天按照幼虾体重3%~5%投饲率进行投喂, 具体根据摄食情况调整投喂量, 每天投喂商业配合饲料(蛋白质含量≈40%) 2次(7:30和18:30), 并在投食1 h后吸出残余饵料, 同时在养殖系统内放置隐蔽物, 以降低罗氏沼虾间自残机率。实验用水为过滤曝气自来水, 每个饲

养单元配有独立增氧设备, 暂养期间保持水体溶解氧(6.3 ± 0.2) mg/L, 水体温度(27 ± 1) °C, 水体pH 7.6~7.8, 碳酸盐碱度为1.5 mmol/L, 水体氨氮浓度<0.3 mg/L, 水体亚硝酸盐浓度<0.02 mg/L。

1.2 急性胁迫实验

虾类养殖池塘碳酸盐碱度的均值在1.94~3.32 mmol/L之间, 而西北内陆型盐碱水域极值范围为1.7~20.0 mmol/L^[3], 故本研究用水为过滤自来水加入相应量的Na₂CO₃、NaHCO₃进行碳酸盐碱度调节, 用0.1 mol/L的HCl和0.1 mol/L NaOH微调, 稳定24 h后用于实验。本研究设置碳酸盐碱度梯度为1.5、5、10、15、20和30 mmol/L, 采用酸碱滴定法监测实验水体碳酸盐碱度, 通过配置相应碱度的更换水体来保持碳酸盐碱度稳定, 各实验组中的碳酸盐碱度实测值为(1.52 ± 0.04) mmol/L、(5.05 ± 0.06) mmol/L、(10.45 ± 0.11) mmol/L、(15.78 ± 0.15) mmol/L、(20.95 ± 0.22) mmol/L和(31.06 ± 0.28) mmol/L。每个碳酸盐碱度梯度设置3个重复, 每个重复在玻璃缸中放置10尾虾, 实验周期幼虾不摄食饲料。实验过程中定时观察幼虾的活动情况, 幼虾沉底后仅剩游泳足微摆的个体被视为昏迷, 对刺激无明显反应的个体则被视为死亡^[22], 分别在12 h、24 h、48 h和96 h记录各组死亡个体数, 死亡后的个体及时捞出。相关计算公式如下:

$$\text{半致死浓度 (LC}_{50}\text{)} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]$$

式中, X_m 为最大剂量的对数值; i 为相邻两组对数剂量的差值; p 为各组罗氏沼虾的死亡率;

$$\text{安全浓度 (SC)} = \frac{48 \text{ h LC}_{50} \times 0.3}{(24 \text{ h LC}_{50} \div 48 \text{ h LC}_{50})^2}$$

1.3 慢性胁迫实验

1.3.1 生长性能 在确定罗氏沼虾幼虾碳酸盐碱度半致死浓度的基础上, 依据半致死浓度设置碳酸盐碱度慢性胁迫实验浓度梯度, 共设置1.5、3、6和9 mmol/L共4个实验组, 分别命名为C1(对照组)、C3、C6和C9组, 碳酸盐碱度调节方法同1.2。挑选规格一致、健康活泼的幼虾[平均体重(2.86 ± 0.11) g]随机放入12个配有增氧设备的玻璃缸内, 每组20尾虾, 每组设置3重复。每天投喂商业配合饲料(蛋白质含量≈40%) 3次(7:30, 11:30, 18:30), 饱食即可, 投喂1 h后捞出剩余饵料称

重。胁迫周期共计 56 d, 一天内采用酸碱滴定对实验水体碳酸盐碱度进行多次测定, 每天换水并通过添加适量的 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 来保持碳酸盐碱度稳定, 实测碱度值分别为 (1.53 ± 0.03) mmol/L、 (3.05 ± 0.05) mmol/L、 (6.16 ± 0.08) mmol/L、 (9.22 ± 0.11) mmol/L。每天记录死亡数量, 采用电子天平记录实验前后罗氏沼虾初始体重和终末体重, 以计算罗氏沼虾幼虾的成活率(survival rate, SR)、增重率(weight gain rate, WGR)、特定生长率(specific growth rate, SGR)和饲料系数(feed coefficient rate, FCR), 相关计算公式如下:

$$\text{成活率(SR, \%)} = \frac{\text{实验末虾尾数}}{\text{实验初虾尾数}} \times 100\%$$

$$\text{增重率(WGR, \%)} = \frac{\text{终末体重} - \text{初始体重}}{\text{初始体重}} \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(SGR, \%d)} = \frac{\ln(\text{终末体重}) - \ln(\text{初始体重})}{\text{实验天数}} \times 100\%$$

$$\text{饲料系数(FCR)} = \frac{\text{总耗料量}}{\text{终末体重} - \text{初始体重}}$$

1.3.2 抱卵率和孵化率检测 选择性成熟的雄虾, 选择标准为其雄性第二步足大大超过身体的长度; 选择卵巢发育至 II 期的雌虾, 选择标准为在头胸甲处可以观察到亮黄色卵巢^[23]。分别设置 1.5、3、6 和 9 mmol/L 共 4 个碳酸盐碱度实验组, 每个重复组放置 10 尾雌虾和 5 尾雄虾, 随机放入 12 个配有增氧设备的玻璃缸内, 每组设置 3 重复。实验周期为 35 d, 期间抱卵虾要单独饲养于相应碳酸盐碱度梯度的水体中。实验结束后, 分别统计卵巢发育成熟的雌虾数量及抱卵蚤虾的数量、亲虾抱卵数量、幼体孵出数量。绝对抱卵量通过解剖相同体长或体重的抱卵虾计算抱卵量来进行推算^[6], 按以下公式计算:

$$\text{孵化率} = \frac{\text{孵出幼体总量}}{\text{抱卵总量}}$$

1.4 样品采集与处理

幼虾养殖实验结束后, 每组重复随机取 3 尾虾的肠道置于 4%多聚甲醛固定, 用于肠道组织形态学观察。每个重复随机另取 3 尾虾, 置于冰面上, 酒精棉球擦拭体表进行消毒, 活体解剖,

取完整肠道去除周围的脂肪和残留的食糜, 用预冷的灭菌生理盐水冲洗数次后立即放入 2 mL 冻存管中液氮速冻, 再转移到 -80°C 冰箱中保存用于肠道菌群结构分析。

1.4.1 肠道组织形态学观察 取新鲜肠道组织样品, 生理盐水冲洗后用 10%中性缓冲福尔马林固定, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 处理好的组织按常规石蜡包埋组织的制备流程进行制备, 制成 4 μm 的石蜡切片^[24]。对石蜡切片分别进行染色。(1) 过碘酸雪夫染色(periodic Acid-Schiff stain, PAS), 具体方法为: 将切片脱蜡、脱水, 经过碘酸氧化和 Schiff 氏液避光染色, 使用苏木精染细胞核, 切片再经脱水、透明、封固后在光学显微镜下观察, 细胞核蓝染, 而含糖类物质(几丁质等)则呈紫红色;(2) 钙荧光白荧光染色(calcofluor white; CFW), 具体方法为, 将切片脱蜡、脱水, 使用钙荧光白荧光染色液(Sigma-Aldrich)染色, 孵育 5 min 后, 切片再经脱水、透明、封固, 使用荧光显微镜观察, 激发波长 355 nm, 散发波长 440 nm。几丁质显示强烈蓝色荧光。

1.4.2 透射电镜样品制备分析 选取 C1、C3、C6 和 C9 组罗氏沼虾幼虾各 2 只, 活体解剖取出肠道, 组织大小 1~2 mm^3 , 置于 1.5 mL 离心管中于 2.5%的戊二醛溶液固定。磷酸缓冲液漂洗 3 次后, 1%的锇酸溶液固定样品 2 h, 酒精梯度脱水, 纯丙酮处理 20 min, Epon 812 树脂包埋。组织样品在 LEICA EM UC7 型超薄切片机中以厚度为 70~90 nm 进行切片, 切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 5~10 min, 透射电镜(JEM-1400Flash)观察拍照。

1.4.3 扫描电镜样品制备分析 选取对照组和 C9 组的罗氏沼虾幼虾各 2 只, 活体解剖取出完整肠道, 在体视显微镜(SMZ-201)下将肠道纵向切开, 观察到管腔表面和包裹食物颗粒的完整围食膜, 全部小心置于 1.5 mL 离心管中于 2.5%的戊二醛溶液固定。固定后, 组织在梯度乙醇中脱水, 并用醋酸异戊酯代替。然后对样品进行临界点干燥、裱片、溅射、镀金, 并用扫描电镜(JSM-840)进行观察。

1.4.4 肠道菌群结构测定 以引物序列 338F (5'-

ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGG TWTCTAAT-3') 进行各样本肠道菌群总 DNA 上 16S rDNA 的 V3-V4 高变区的 PCR 扩增^[25]。PCR 扩增体系 20 μL: 5×Fast Pfu buffer 15 μL, 上下游引物(5 μmol/L)各 0.2 μL, BSA 0.2 μL, Model 模板 DNA 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL; FastPfu DNA Polymerase 0.4 μL; ddH₂O 补足体系。PCR 反应条件: 94 °C 高温变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 4 °C 保持。PCR 结束后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测每个样本的 PCR 产物。扩增后的样本在 Illumina-Mi Seq 平台上完成高通量测序。

1.5 生物信息学分析

对测序获得的双端序列数据进行质控处理。根据 PE reads 之间的 Overlap 关系, 利用 FLASH(v1.2.7)将每个样品的 reads 拼接成原始 Tags 数据。采用 Trimmomatic (v0.33)软件, 对原始 Tags 数据进行过滤得到优质序列。通过 UCHIME (v4.2)比对去除序列的嵌合体以获得有效序列。基于 QIIME (v18.0)软件, 利用 UCLUST 对序列相似度 $\geq 97\%$ 的全部 tags 进行聚类形成 OTUs (operational taxonomic units), 所有数据均在数据库 Silva

(<https://www.arb-silva.de/>)中对其进行分类学注释, 绘制不同生物分类水平上的肠道菌群相对丰度和组成结构^[26]。利用 Mother (v.1.30)软件基于 OTUS 进行 Alpha 多样性分析, 包括 Observed-OTUs、Chao1、Shannon 和 Simpson 等指数, 使用 QIIME 软件进行 Beta 多样性分析, 主要采用 weighted_unifrac 和 unweighted_unifrac 算法进行 NMDS 分析来对比样本间的差异。最后, 使用 PICRUSt 软件预测罗氏沼虾各样本间肠道菌群功能^[27]。

1.6 数据统计与分析

实验数据以 3 个重复样本数据的平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示。采用 SPSS 26.0 对数据进行统计分析, 先对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 再用 Duncan 氏法进行多重比较。显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 急性碳酸盐碱度对罗氏沼虾幼虾的毒性作用

随着碳酸盐碱度浓度的升高,罗氏沼虾幼虾死亡率也相应增加(表 1)。与对照组相比,低浓度碳酸盐实验组中,幼虾能够正常存活;高浓度碳酸盐碱度实验组中,幼虾游泳速度显著下降,短时间内开始出现死亡现象,在碱度 30 实验组中更为严重。若对照组中出现死亡现象,

表 1 罗氏沼虾幼虾不同碱度下的死亡率、半致死碱度及安全浓度
Tab. 1 Mortality, half lethal alkalinity and safe concentration of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* under different concentration of carbonate alkalinity

 $n=3; \bar{x} \pm \text{SE}$ [illegible]

可根据公式 $p=(p'-c)/(1-c)$ 计算各组校正后的死亡百分数, 其中, p 为校正后的死亡百分数, p' 为实验组观察所得死亡百分数, c 为对照组的死亡百分数^[35]。通过碱度对罗氏沼虾幼虾毒性的分析可知, 幼虾在 12、24、48 和 96 h 的 LC_{50} 碱度分别为 28.69、24.15、21.52 和 17.86 mmol/L, 安全浓度为 5.118 mmol/L。

2.2 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾生长性能的影响

不同碳酸盐碱度胁迫下, 罗氏沼虾幼虾的生长性能如表 2 所示。与对照组相比, 各实验组间幼虾增重率、特定生长率和成活率均随碳酸盐碱度浓度的升高而降低。与对照组相比, C3 组碳酸盐碱度对幼虾生长性能未造成显著影响($P>0.05$); C6

和 C9 组实验幼虾增重率、特定生长率和成活率呈显著下降($P<0.05$), 均在 C9 组显著低于其他实验组($P<0.05$)。饲料系数随碳酸盐碱度浓度的上升而升高, 在 C9 组显著高于其他实验组($P<0.05$)。

2.3 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾抱卵率和孵化率的影响

碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾抱卵率和孵化率影响如表 3 所示, 各实验组间雌虾均能抱卵, 且抱卵率和孵化率均随碳酸盐碱度浓度的升高而降低。与对照组相比, C3 组碳酸盐碱度对罗氏沼虾的繁殖性能影响不显著($P>0.05$); C6 组雌虾抱卵率和孵化率均显著低于对照组和 C3 组($P<0.05$), C9 组雌虾抱卵率和孵化率则显著低于其他 3 组实验组($P<0.05$)。

表 2 碳酸盐碱度对罗氏沼虾幼虾生长性能的影响
Tab. 2 Effects of carbonate alkalinity on the growth performance of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*

$n=3$; $\bar{x}\pm SE$

项目 item	组别 group			
	C1	C3	C6	C9
初始体重/g initial body weight	2.87±0.09	2.88±0.11	2.86±0.18	2.84±0.14
终末体重/g final body weight	7.02±0.31 ^a	6.68±0.41 ^a	5.40±0.47 ^b	4.26±0.16 ^c
增重率/% WGR	144.45±16.18 ^a	131.55±14.81 ^a	89.98±25.67 ^b	50.17±8.98 ^c
特定生长率/(%/d) SGR	2.55±0.19 ^a	2.40±0.16 ^a	1.82±0.37 ^b	0.16±0.11 ^c
饲料系数 FCR	1.65±0.15 ^a	1.80±0.14 ^a	2.75±0.53 ^b	4.86±0.78 ^c
成活率/% SR	93.33±2.89 ^a	91.67±2.89 ^a	63.33±10.41 ^b	28.33±5.77 ^c

注: 同一行不同上标字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Different superscript letters in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

表 3 碳酸盐碱度对罗氏沼虾幼虾抱卵率和孵化率的影响
Tab. 3 Effects of carbonate alkalinity on the spawning rate and egg incubation rate of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*

$n=3$; $\bar{x}\pm SE$

项目 item	组别 group			
	C1	C3	C6	C9
抱卵率/% spawning rate	71.61±5.51 ^a	65.67±4.04 ^a	40.33±4.51 ^b	22.66±7.64 ^c
孵化率/% rate of eggs incubation	45.26±6.31 ^a	42.68±5.41 ^a	35.41±3.47 ^b	18.33±3.16 ^c

注: 同一行不同上标字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Different superscript letters in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

2.4 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛结构的影响

在不同碳酸盐碱度慢性胁迫下罗氏沼虾肠道微绒毛变化情况如图 1 所示。透射电镜结果显示, 对照组罗氏沼虾幼虾肠道细胞结构较为完整, 肠

道微绒毛排列紧密而有序(图 1a)。随碳酸盐碱度浓度升高, 罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛脱落程度加剧, 且有逐渐变为椭圆形的趋势(图 1b~1d)。与对照组相比, 高碳酸盐碱度 C9 组中幼虾肠道微绒毛结构排列紊乱(图 1d)。

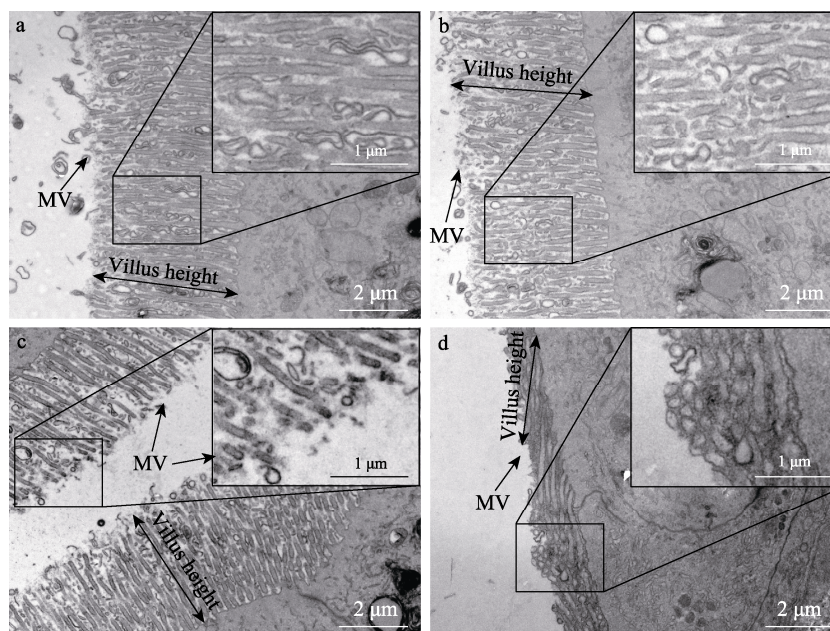


图 1 罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛透射电镜图

a. 对照组; b. 碳酸盐碱度 3 mmol/L 组; c. 碳酸盐碱度 6 mmol/L 组; d. 碳酸盐碱度 9 mmol/L 组. MV: 微绒毛.

Fig. 1 Representative transmission electron microscopy images of the intestinal microvilli of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*
a. Control group; b. Carbonate alkalinity 3 mmol/L; c. Carbonate alkalinity 6 mmol/L;
d. Carbonate alkalinity 9 mmol/L. MV: microvilli.

2.5 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道围食膜结构的影响

PAS 染色结果显示, 对照组幼虾肠腔中充满食物残渣, 食物残渣外部包裹一层致密的紫红色的围食膜, 肠腔高度扩张, 上皮层完整, 排列有序(图 2a); C3 组肠腔中出现少量的脱落的上皮细胞(图 2b); C6 组肠腔中出现大量的脱落的上皮细胞, 围食膜破碎(图 2c); C9 组肠腔中出现成片脱落的上皮细胞, 围食膜结构破损严重, 上皮细胞变得十分扁平, 细胞排列凌乱(图 2d)。

进一步利用 CFW 染色观察其围食膜结构, 结果显示, 对照组幼虾肠腔中围食膜结构完整, 荧光信号强, 致密, 并紧密包裹食物残渣(图 3a); C3 组肠腔中围食膜结构较完整, 荧光信号强, 致密, 并紧密包裹着内容物(图 3b); C6 组肠腔中围食膜出现破损, 呈散块状包覆在内容物上, 荧光信号弱, 表明其质地脆弱(图 3c); C9 组肠腔中围食膜呈游离团块状, 荧光信号大幅降低, 表明围食膜结构已严重受损(图 3d)。说明碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾肠道围食膜造成一定程度损伤。

根据 PAS 和 CFW 染色的结果, 挑选围食膜

结构影响水平最大的 C9 组与对照组进行扫描电镜分析, 如图 4 所示。碳酸盐碱胁迫下罗氏沼虾肠道围食膜出现明显形变。在×5000 倍数下, 对照组肠道围食膜表面光滑、有光泽, 整体较为平整(图 4a), C9 组肠道围食膜表面较为粗糙、暗淡, 整体呈波浪形, 存在多个皱褶(图 4d); 在×10000 倍数下, 对照组肠道围食膜表面光滑致密(图 4b), C9 组肠道围食膜表面粗糙, 结构松散(图 4e); ×100000 倍数下, 对照组肠道围食膜结构紧密, 几丁质层平整、光滑, 围食膜孔隙较小(图 4c); C9 组肠道围食膜结构松散, 几丁质层表面粗糙, 围食膜孔隙较大(图 4f)。

2.6 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道菌群 Alpha 多样性分析

在 0.97 的相似度下, 各实验组幼虾肠道样品通过高通量测序和数据分析共获得 3131 个 OTUs (448654 个 reads)。韦恩图呈现了每个样本的 OTU 数量, 其中 C1、C3、C6 和 C9 组样品中检出的 OTU 数依次为 1310、1174、1140、1322 个, 共有的 OTU 数为 512 个(图 5), 从韦恩图数据可知共有的 OTU 的比例接近一半, 说明尽管投喂相同配

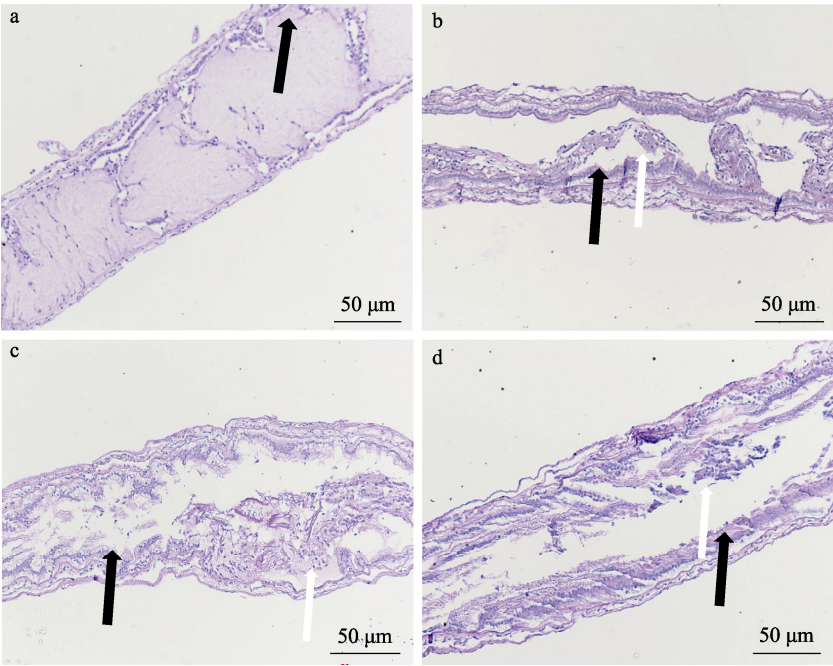


图 2 罗氏沼虾幼虾肠道组织 PAS 染色图

a. 对照组; b. 碳酸盐碱度 3 mmol/L; c. 碳酸盐碱度 6 mmol/L; d. 碳酸盐碱度 9 mmol/L.
黑色箭头为围食膜; 白色箭头为脱落的上皮细胞.

Fig. 2 PAS staining histology of intestinal tissues of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*
a. Control group; b. Carbonate alkalinity 3 mmol/L; c. Carbonate alkalinity 6 mmol/L; d. Carbonate alkalinity 9 mmol/L. The black arrowheads are peritrophic matrices; the white arrowheads are the shed epithelial cells.

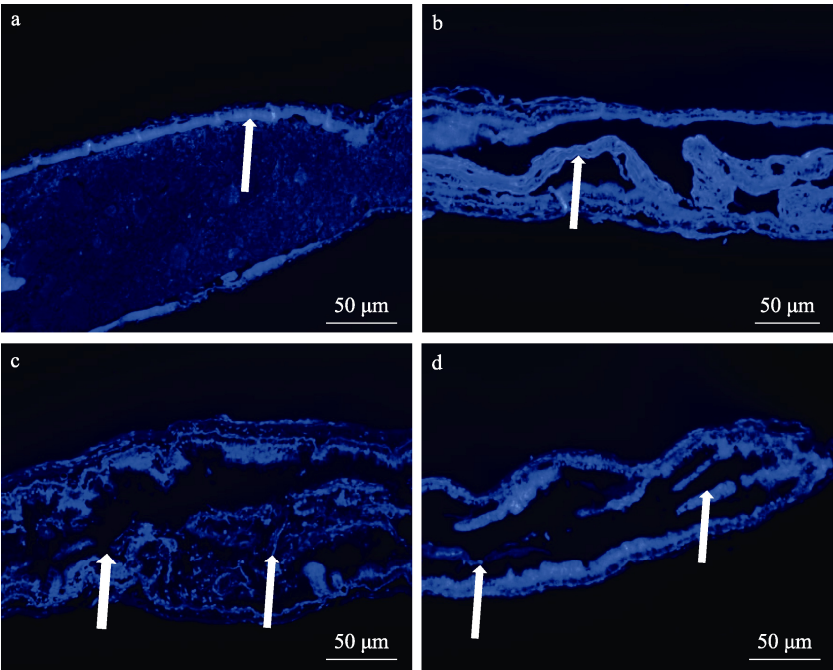


图 3 罗氏沼虾幼虾肠道组织钙荧光白荧光染色(CFW)染色图

a. 对照组; b. 碳酸盐碱度 3 mmol/L; c. 碳酸盐碱度 6 mmol/L; d. 碳酸盐碱度 9 mmol/L. 白色箭头指示围食膜.
Fig. 3 Calcofluor white (CFW) staining histology of intestinal tissues of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*
a. Control group; b. Carbonate alkalinity 3 mmol/L; c. Carbonate alkalinity 6 mmol/L; d. Carbonate alkalinity 9 mmol/L. The white arrowheads point to peritrophic matrices.

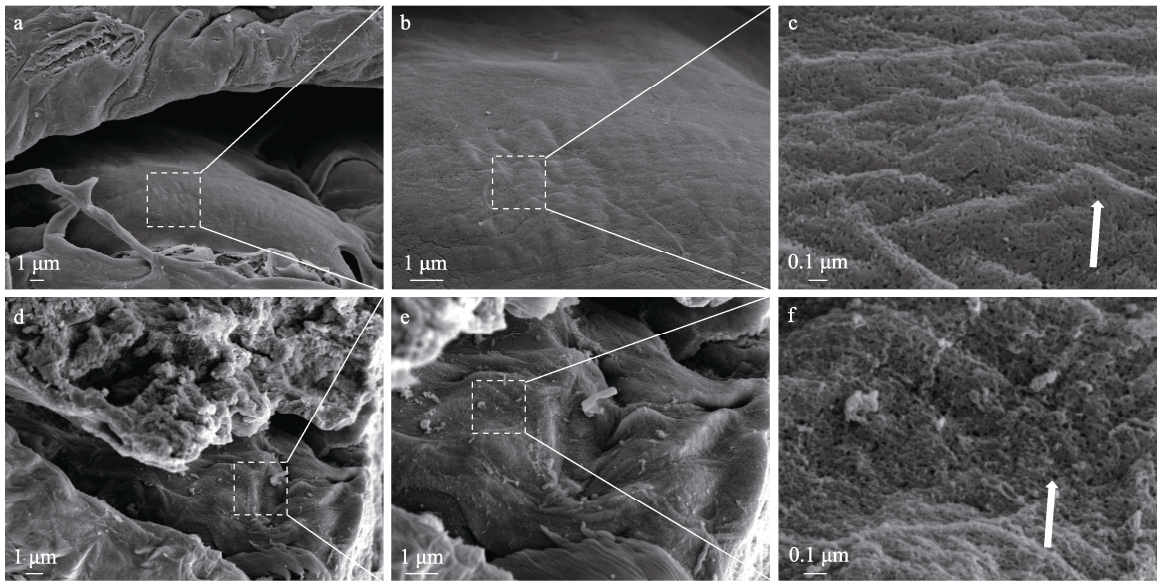


图 4 罗氏沼虾幼虾肠道围食膜扫描电镜图

a. ×5000 倍数下对照组; b. ×10000 倍数下对照组; c. ×100000 倍数下对照组; d. ×5000 倍数下 C9 组(碳酸盐碱度 9 mmol/L); e. ×10000 倍数下 C9 组; f. ×100000 倍数下 C9 组. 白色箭头为围食膜孔隙.

Fig. 4 Representative scanning electron microscope images of the intestinal peritrophic matrix of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*
a. Control group at ×5000 times; b. Control group at ×10000 times; c. Control group at ×100000 times;
d. Group C9 (carbonate alkalinity 9 mmol/L) at ×5000 times; e. Group C9 at ×10000 times; f. Group C9 at ×100000 times. The white arrowheads are peritrophic matrix pores.

合饲料, 其在不同碳酸盐碱度环境下罗氏沼虾幼虾肠道细菌群落仍具有一定相似性。此外, Alpha 多样性分析结果显示(表 4), C9 组肠道样品中的菌群丰富度指数 Chao1 与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 但是显著高于 C3 和 C6 实验组 ($P<0.05$); 肠道菌群多样性指数 Shannon 和 Simpson 在各实验组间差异不显著 ($P>0.05$)。

2.7 Beta 多样性分析

基于 Weighted_Unifrac 距离对所有肠道样品菌群组成进行 NMDS 分析后发现, 与对照组相比, 各实验组的肠道样品之间距离较大, 大部分散于

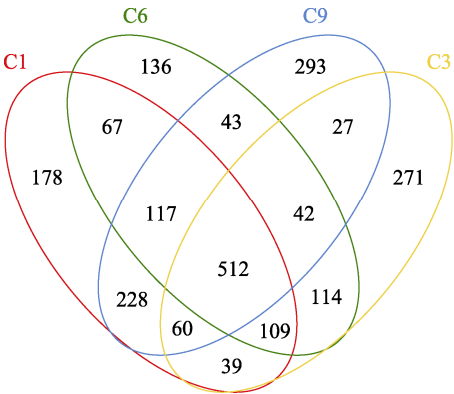


图 5 碳酸盐碱度胁迫下罗氏沼虾肠道菌群 Venn 图
Fig. 5 Venn diagram of intestinal microbiota in *Macrobrachium rosenbergii* with carbonate alkalinity

表 4 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道菌群 Alpha 多样性指数的影响

Tab. 4 Effect of carbonate alkalinity on the Alpha diversity index of intestinal microbiota in *Macrobrachium rosenbergii*
 $n=3$; $\bar{x}\pm\text{SE}$

项目 item	组别 group			
	C1	C3	C6	C9
可操作分类单元 OTUs	979±153 ^{ab}	768±65 ^b	862±82 ^{ab}	1031±66 ^a
Chao1 指数 Chap1 index	1193.89±155.56 ^{ab}	832.89±86.55 ^c	981.43±118.62 ^{bc}	1312.43±54.54 ^a
香农指数 Shannon index	4.79±0.54 ^a	4.36±0.16 ^a	4.83±0.09 ^a	5.00±0.28 ^a
辛普森指数 Simpson index	0.03±0.02 ^a	0.04±0.01 ^a	0.02±0.00 ^a	0.03±0.01 ^a

注: 同一行不同上标字母表示组间存在显著差异 ($P<0.05$).
Note: Different superscripts in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

不同象限, 而组内差异较小, 大都聚集在一起, 说明不同实验组的肠道样品间菌群结构相似性较小(图 6)。

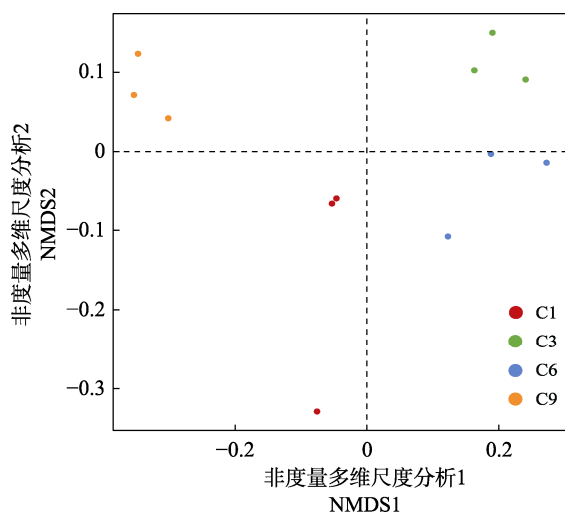


图 6 基于 NMDS 分析的加权 UniFrac 分析
Fig. 6 NMDS analysis chart by weighted UniFrac

2.8 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道菌群结构的影响

基于层次聚类树分析结果显示, 4 组样品被分为 3 大类, 其中对照组和 C9 组各自单独聚为一类, C3 和 C6 组聚为一类, 这说明与对照组样品相比,

C3 和 C6 组样品中菌群结构的相似度更为接近(图 7)。在门的水平上, 共鉴定出 33 个细菌门类, 12 个样品中均有分布且为优势菌门(平均相对丰度 >1%)的是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 这 6 类优势菌群占肠道菌群的比例超过 90%。如图 7 所示, 随碳酸盐碱度升高, C9 组样品中菌门组成丰度与对照组相比出现明显变化, 其中拟杆菌门物种丰度明显升高。进一步对罗氏沼虾肠道菌群在属的水平上进行分析结果如表 5 所示。与对照组相比, 在高碳酸盐碱度胁迫下, C9 组幼虾肠道条件致病菌黄杆菌属(*Flavobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种丰度显著高于其他实验组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 罗氏沼虾幼虾对碳酸盐碱度的耐受能力

本研究发现罗氏沼虾幼虾 96 h 的碳酸盐碱度 LC_{50} 值为 17.86 mmol/L, 这与王桂春等^[28]在罗氏沼虾仔虾中得出的碳酸盐碱度 LC_{50} 值相接近。本研究发现高碳酸盐碱度水体会腐蚀虾的鳃组织, 造成虾呼吸障碍, 与王慧等^[29]研究结果相类似。高碳酸

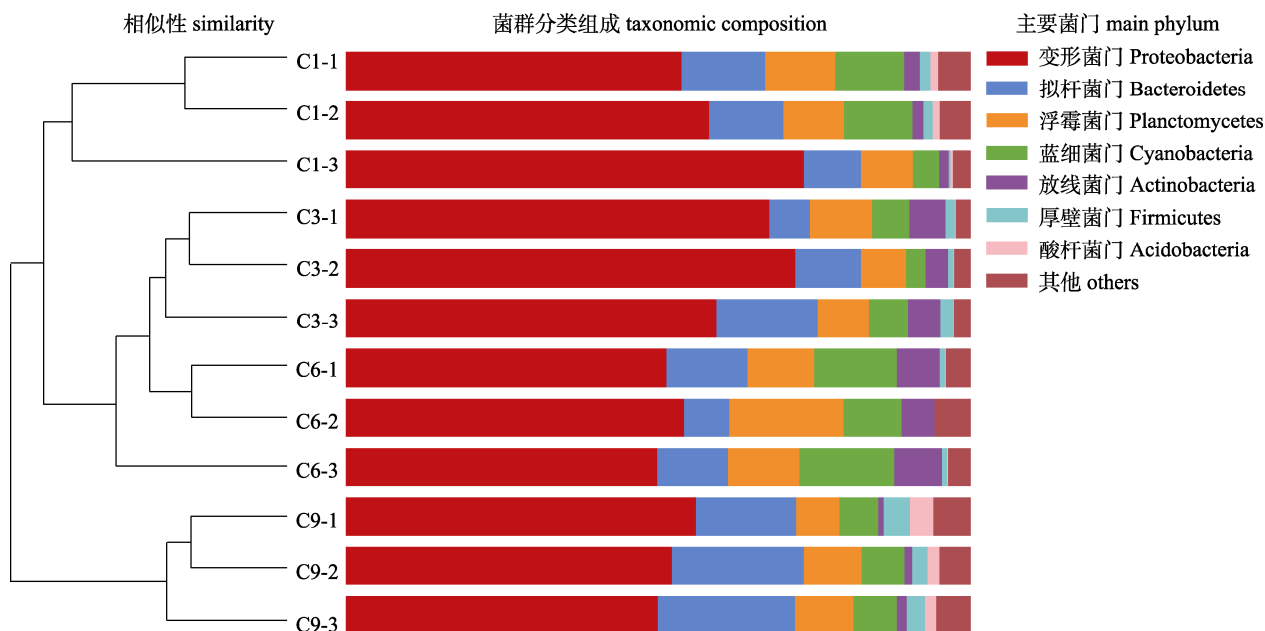


图 7 门水平上各碳酸盐碱度胁迫组罗氏沼虾肠道菌群水平聚类分析
Fig. 7 Cluster analysis of intestinal microbiota from *Macrobrachium rosenbergii* exposed to different carbonate alkalinity at the level of phylum

表 5 碳酸盐碱度慢性胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道不同菌群属水平相对丰度差异的影响
Tab. 5 Effect of carbonate alkalinity on the relative community abundance on genus levels
of different intestinal microbiota in *Macrobrachium rosenbergii*

n=3; $\bar{x}\pm\text{SE}$

项目 item	组别 group			
	C1	C3	C6	C9
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	0.82±0.38 ^b	0.24±0.05 ^b	0.38±0.09 ^b	7.12±1.25 ^a
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.20±0.00 ^b	0.10±0.04 ^b	0.04±0.01 ^b	0.31±0.07 ^a
脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0.02±0.02 ^a	0.01±0.01 ^a	0.00±0.00 ^a	0.04±0.03 ^a

注: 同一行不同上标字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Notes: Different superscripts in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

盐碱度条件下 Ca^{2+} 也会以沉淀析出, 较低的 Ca^{2+} 浓度会进一步影响虾的蜕皮及其他正常生理活动^[30], 这是高碳酸盐碱度胁迫影响虾类存活的原因之一。罗氏沼虾碳酸盐碱度半致死浓度普遍高于其他经济虾类, 譬如中国对虾(*Denaeus chinensis*) 96 h 碳酸盐碱度 LC_{50} 值为 6.18 mmol/L^[31-32], 脊尾白虾 96 h 碳酸盐碱度 LC_{50} 值为 8.73 mmol/L^[6], 而凡纳滨对虾幼虾 96 h LC_{50} 值为 10.49 mmol/L^[33], 由此可知, 罗氏沼虾对碳酸盐碱度胁迫具有较强的适应能力, 适宜在盐碱水中养殖。

3.2 慢性碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾幼虾生长性能和肠道组织结构的影响

增重率、特定生长率和成活率是衡量水产动物生长和养殖效益的重要指标, 也是判断盐碱水养殖罗氏沼虾生长性能的主要手段^[34]。杨富亿等^[35]、赵丽慧等^[36]研究发现碳酸盐碱胁迫会抑制鱼虾的生长, 这与本研究结果相吻合, 产生这一现象的原因可能是高碳酸盐碱度胁迫会对鳃和肠道的组织结构产生损害, 影响机体呼吸代谢和消化吸收能力, 并导致其生长速率减慢^[37-38], 鉴于罗氏沼虾拥有较为低等的开放式循环系统, 血淋巴中的酸碱平衡变化会影响到其他组织, 如肠道等^[39], 本研究进一步通过透射电镜分析, 观察到碳酸盐碱度慢性胁迫下罗氏沼虾肠道微绒毛的脱落, 且脱落程度与碳酸盐碱度浓度呈正相关, 证实高碳酸盐碱度慢性胁迫下肠道组织结构损伤是导致罗氏沼虾幼虾生长受到抑制的主要原因。

3.3 慢性碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾幼虾抱卵率和孵化率的影响

有关碳酸盐碱度对水生动物繁殖影响的关注

报道较少, 在本研究中, 当水体碳酸盐碱度为 3 mmol/L 时, 罗氏沼虾幼虾抱卵率和孵化率均不受碱度胁迫影响, 抱卵罗氏沼虾的受精卵均可孵化, 但在 9 mmol/L 碱度水体时, 雌虾未能进行有效繁殖, 这与在脊尾白虾中的研究结果相一致^[6], 已有研究通过对碳酸盐碱胁迫下脊尾白虾眼柄和卵巢进行转录组分析, 发现繁殖性能的下降与盐碱胁迫抑制神经内分泌激素有关^[40], 这一现象背后的具体作用途径及其机制值得后续深入研究。

3.4 慢性碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道围食物膜结构的影响

鉴于甲壳动物肠道微绒毛具有分泌围食膜的功能^[41], 高碳酸盐碱度胁迫下罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛结构损伤会导致其黏液层(围食膜)的屏障作用受到影响。围食膜是一种非细胞结构, 由几丁质纤维和蛋白质组成, 由中肠上皮细胞合成和分泌, 它位于中肠上皮细胞内壁, 是肠道与食物残渣之间的机械屏障, 能够防止机体受到物理损伤和病原体入侵^[42]。本研究中, 随着碳酸盐碱度的升高, 通过不同染色方式观察到罗氏沼虾肠道围食膜结构破碎, 进一步采用扫描电镜观察到围食膜表面粗糙和孔隙增大。有研究指出肠道细菌可能利用自身的几丁质酶增大围食膜的渗透性和孔隙^[43], 提示高碳酸盐碱度慢性胁迫下肠道围食膜结构受损可能与肠道菌群结构失调有关。

3.5 慢性碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道菌群结构的影响

甲壳类动物肠道菌群的动态平衡在维持肠道健康方面发挥着至关重要的作用, 稳定的肠道菌群结构有利于其营养吸收、免疫调节和抵御病原

体^[44-45]。在本研究中, 罗氏沼虾肠道样品中的优势菌群均为变形菌门、拟杆菌门与厚壁菌门等, 这与先前虾类研究报道的结果相一致^[46]。低碳酸盐碱度胁迫下, 罗氏沼虾肠道菌群的丰富度显著下降, 而多样性指数不论在低碱度或高碱度胁迫下均无显著变化, 其原因是水生动物肠道菌群与水体环境中的微生物群落结构存在一定的相关性^[47], 而碱度变化可能会影响水体和罗氏沼虾肠道稀有菌群和条件稀有菌群的丰度^[48]。已有学者指出, 评价肠道健康状况的依据主要是少数致病菌的增加或减少而非总体菌群丰度和多样性的变化^[49], 由此本研究更关注罗氏沼虾肠道样品中条件致病菌丰度的变化趋势, 如黄杆菌属、假单胞菌属和脱硫弧菌属的丰度上升, 三者都是条件致病菌^[50], 其成为优势菌可能会增加盐碱水养殖罗氏沼虾幼虾疾病暴发的风险, 碳酸盐碱度胁迫对罗氏沼虾幼虾肠道致病菌丰度的调控作用尚有待于深入研究。

4 总结

综上所述, 罗氏沼虾对碳酸盐碱度表现出较好的耐受性。在本实验条件下, 低于 3 mmol/L 的碳酸盐碱度值条件下, 罗氏沼虾能够正常生长繁殖, 但当高碳酸盐碱度 9 mmol/L 慢性胁迫下罗氏沼虾的生长和繁殖均受到显著抑制。组织形态学结果显示, 碳酸盐碱慢性胁迫会损害罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛结构和围食膜结构, 且损伤呈剂量依赖性; 高碳酸盐碱慢性胁迫会改变幼虾肠道菌群结构从而增加其患病风险, 由此, 亟需选育耐盐碱罗氏沼虾良种来有效利用长期闲置碳酸盐型盐碱水资源。

参考文献:

- [1] Li S S, Wang Y L, Yao X L, et al. Effects of different salt stress on osmolality, ion transport system, and immune-related genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(8): 942-952. [李帅帅, 王艳玲, 姚晓丽, 等. 不同盐胁迫对鳊渗透压、离子转运系统和免疫基因的影响[J]. 中国水产科学, 2023, 30(8): 942-952.]
- [2] Liu Y X, Fang H, Lai Q F, et al. The current state and development strategy for China's saline-alkaline fisheries[J]. Strategic Study of CAE, 2016, 18(3): 74-78. [刘永新, 方辉, 来琦芳, 等. 我国盐碱水渔业现状与发展对策[J]. 中国工程科学, 2016, 18(3): 74-78.]
- [3] Shi Y L. Studies on water quality characteristics and change regulations of culture ponds with heavy saline-alkaline soil[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009. [石玉龙. 重盐碱地养殖池塘水质特征及变化规律的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.]
- [4] Zhou K, Lai Q F, Wang H, et al. Acute toxicity effects of calcium and magnesium on larva of *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2007, 31(7): 4-7. [周凯, 来琦芳, 王慧, 等. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对凡纳滨对虾仔虾生存的影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 4-7.]
- [5] Yao Z L, Wang H, Zhou K, et al. Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post-larval *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(5): 945-950. [么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(5): 945-950.]
- [6] Liu F, Li J, Li J T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1137-1147. [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137-1147.]
- [7] Li M S. The development of saline-alkali aquaculture requires food from saline-alkali soil and water[J]. China Fisheries, 2023(11): 35-36. [李明爽. 发展盐碱水养殖向盐碱水主要食物[J]. 中国水产, 2023(11): 35-36.]
- [8] The General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Notice of the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the implementing the "Five Major Actions" of green and healthy aquaculture in 2020[J]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2020(5): 86-87. [农业农村部办公厅. 农业农村部办公厅关于实施 2020 年水产绿色健康养殖“五大行动”的通知[J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2020(5): 86-87.]
- [9] Wang Y. Pathways of HCO_3^- metabolism and transport in *Oreochromis niloticus* under carbonate alkalinities[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [王燕. 碳酸盐碱度胁迫下尼罗罗非鱼 HCO_3^- 离子代谢和转运的途径[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [10] Yao M Z. Research on metabonomics of *Carassius auratus* gill under NaHCO_3 habitat stress[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [姚明珠. NaHCO_3 生境胁迫下鲫鳃代谢组学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]

- [11] Liu Y M, Bao T, Li H, et al. Molecular characterization of *GpHsp60* from juvenile *Gymnocypris przewalskii*: Effects of alkalinity on its expression[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(5): 553-562. [刘一萌, 包钺, 李航, 等. 青海湖裸鲤幼鱼热激蛋白 60 基因克隆及其在碳酸盐碱度胁迫下的表达[J]. 海洋渔业, 2021, 43(5): 553-562.]
- [12] Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124. [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.]
- [13] Zeng F Y, Luo K, Luan S, et al. Analysis of growth and survival among different families of *Litopenaeus vannamei* in the chloride typed alkaline water[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 308-315. [曾凡勇, 罗坤, 栾生, 等. 凡纳滨对虾在氯化物型盐碱水养殖环境下不同家系间生长、存活性能分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 308-315.]
- [14] Yang F Y, Li X J, Yang X Q. Adaptability of *Macrobrachium nipponense* juvenile to water alkalinity and pH[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 74-79. [杨富亿, 李秀军, 杨欣乔. 日本沼虾幼虾对碱度和 pH 的适应性[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 74-79.]
- [15] Fang W, Liu L, Chang W, et al. Comparative analysis of growth and nutritional components of *Scylla paramamosa* in cultured in saline-alkali water and marine water[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(11): 2143-2157. [方伟, 刘磊, 常雯, 等. 盐碱水和海水养殖条件下的拟穴青蟹生长和营养成分比较分析[J]. 水产学报, 2022, 46(11): 2143-2157.]
- [16] New M B. Status of freshwater prawn farming: A review[J]. Aquaculture Research, 1995, 26(1): 1-54.
- [17] Yen P T, Bart A N. Salinity effects on reproduction of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. Aquaculture, 2008, 280(1-4): 124-128.
- [18] Chand B K, Trivedi R K, Dubey S K, et al. Effect of salinity on survival and growth of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. Aquaculture Reports, 2015, 2: 26-33.
- [19] González-Vera C, Brown J H. Effects of alkalinity and total hardness on growth and survival of postlarvae freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879)[J]. Aquaculture, 2017, 473: 521-527.
- [20] 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.
- [21] Rajeev R, Adithya K K, Kiran G S, et al. Healthy microbiome: A key to successful and sustainable shrimp aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(1): 238-258.
- [22] Xiong Z D, Dai X L, Xie J, et al. Acute toxicity of endosulfan to zoea and postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(11): 111-114. [熊昭娣, 戴习林, 谢剑, 等. 硫丹对罗氏沼虾蚤状幼体及仔虾的急性毒性作用[J]. 广东农业科学, 2013, 40(11): 111-114.]
- [23] Hu R H, Shi W J, Wang P, et al. Research progress on reproductive biology of important economic shrimps of Palaemonoidea[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(4): 485-502. [胡润豪, 史文军, 王盼, 等. 长臂虾科几种重要经济虾类的繁殖生物学研究进展[J]. 海洋渔业, 2021, 43(4): 485-502.]
- [24] Sun S M, Bian C, Zhou N, et al. Dietary Astragalus polysaccharides improve the growth and innate immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Insights from the brain-gut axis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 243: 125158.
- [25] Zeng C X, Lin M, Li Z Q, et al. The structural and functional characteristics of the gut microbiota of *Marsupenaeus japonicus* as revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1857-1866. [曾晨熾, 林茂, 李忠琴, 等. 基于 16S rRNA 基因扩增子测序分析日本囊对虾肠道菌群结构与功能的特征[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1857-1866.]
- [26] Lakhujani V, Badapanda C. prepare_taxa_charts.py: A python program to automate generation of publication ready taxonomic pie chart images from QIIME[J]. Genomics Data, 2017, 12: 97-101.
- [27] Douglas G M, Maffei V J, Zaneveld J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 685-688.
- [28] Wang G C, Zhang Z Q, Dong S L, et al. Studies of toxicity of NaCl and alkalinity to post-larval *M. rosenbergii*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(4): 523-528. [王桂春, 张兆琪, 董双林, 等. 氯化钠和碱度对罗氏沼虾仔虾的毒性研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(4): 523-528.]
- [29] Wang H, Fang W H, Lai Q F. Effects of concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} on survival and growth of *Penaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(1): 82-86. [王慧, 房文红, 来琦芳. 水环境中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对中国对虾生存及生长的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 82-86.]
- [30] Zhao L H, Zhao J L, Jeerawat T, et al. Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696-

1704. [赵丽慧, 赵金良, Thammaratsuntorn Jeerawat, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1696-1704.]
- [31] Zhou Y J. Effects of saline-alkali stress on growth, reproduction and immune function of *Penaeus chinensis*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023. [周玉洁. 盐碱胁迫对中国对虾生长、繁殖及免疫功能的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.]
- [32] Fang W H, Wang H, Lai Q F. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(4): 78-81. [房文红, 王慧, 来琦芳. 碳酸盐碱度、pH 对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学 2000, 7(4): 78-81.]
- [33] Yang F Y, Li X J, Yang X Q, et al. Adaptability of *Litopenaeus vannamei* to carbonate saline-alkaline waters in Northeast China[J]. Marine Sciences, 2008, 32(1): 41-44. [杨富亿, 李秀军, 杨欣乔, 等. 凡纳滨对虾对东北碳酸盐型盐碱水域的适应能力[J]. 海洋科学, 2008, 32(1): 41-44.]
- [34] Kong J, Luan S, Tan J, et al. Progress of study on penaeid shrimp selective breeding[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(9): 81-97. [孔杰, 栾生, 谭建, 等. 对虾选择育种研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 81-97.]
- [35] Yang F Y, Li X J, Tian M Z, et al. Correlation between survival and growth of prawn and K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+/K^+ , and M/D in alkaline waters in the west part of Northeast China[J]. Marine Science Bulletin, 2009, 28(1): 21-28. [杨富亿, 李秀军, 田明增, 等. 东北西部碱水水域对虾生存和生长与 K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+/K^+ 及 M/D 的关系[J]. 海洋通报, 2009, 28(1): 21-28.]
- [36] Zhao L H, Zhao J L, Jeerawat T, et al. Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696-1704. [赵丽慧, 赵金良, Thammaratsuntorn Jeerawat, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1696-1704.]
- [37] Su H H, Li Y Y, Ma D M, et al. Metabolism responses in the intestine of *Oreochromis mossambicus* exposed to salinity, alkalinity and salt-alkalinity stress using LC-MS/MS-based metabolomics[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics, 2023, 45: 101044.
- [38] Ge Q Q, Wang J J, Li J T, et al. Effect of high alkalinity on shrimp gills: Histopathological alternations and cell specific responses[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 256: 114902.
- [39] Wang C, An L, Dong X S, et al. The tricarboxylic acid cycle is inhibited under acute stress from carbonate alkalinity in the gills of *Eriocheir sinensis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2024, 51: 101245.
- [40] Zhang X H, Li J T, Wang J J, et al. Effects of long-term saline-alkaline stress on growth and ovary development of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 049611. [张秀红, 李吉涛, 王佳佳, 等. 长期碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 2024, 48(4): 049611.]
- [41] Siddiqui J A, Khan M M, Bamisile B S, et al. Role of insect gut microbiota in pesticide degradation: A review[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 870462.
- [42] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function[J]. Annual Review of Entomology, 2009, 54(1): 285-302.
- [43] Plymale R, Grove M J, Cox-Foster D, et al. Plant-mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae[J]. Journal of Insect Physiology, 2008, 54(4): 737-749.
- [44] Liao G W, Wu Q P, Mo B H, et al. Intestinal morphology and microflora to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 121: 437-445.
- [45] Ghosh S, Whitley C S, Haribabu B, et al. Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites[J]. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2021, 11(5): 1463-1482.
- [46] Zeng S Z, He J G, Huang Z J. The intestine microbiota of shrimp and its impact on cultivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): Article No.362.
- [47] Morshed S M, Chen Y Y, Lin C H, et al. Freshwater transfer affected intestinal microbiota with correlation to cytokine gene expression in Asian Sea bass[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1097954.
- [48] Jia X, Dini-Andreote F, Salles J F. Community assembly processes of the microbial rare biosphere[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(9): 738-747.
- [49] Prasai T P, Walsh K B, Bhattarai S P, et al. Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces *Campylobacter* load[J]. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0154061.
- [50] Kumru S, Tekedar H C, Blom J, et al. Genomic diversity in flavobacterial pathogens of aquatic origin[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 142: 104053.

Effects of carbonate alkalinity on growth and intestinal health of *Macrobrachium rosenbergii*

CHEN Luxi¹, JIN Yiting¹, WU Yijie¹, SUN Shengming^{1,2}

1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University; Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China

Abstract: A large area of China is covered by saline-alkali water with high salinity, high pH, and ion ratio imbalance. *Macrobrachium rosenbergii* is an economically important aquaculture species worldwide due to its rapid growth and low demand for animal feed. Considering the fact that the *M. rosenbergii* has wide adaptability to salinity and high resistance to alkalinity stresses, an experiment was conducted to investigate the effects of carbonate alkalinity stress on the growth, reproduction, and intestinal health of *M. rosenbergii* to effectively utilize the abandoned saline-alkali water in China and establish a model of inland saline-alkali water cultured *M. rosenbergii*. Juvenile *M. rosenbergii* [(2.85±0.12) g] were subjected to an acute carbonate alkalinity stress experiment to determine the 96-hour lethal concentration (LC₅₀). Based on this, four carbonate alkalinity concentrations, i.e., 1.5 (control group), 3, 6, and 9 mmol/L, designated as control C1, C3, C6, and C9, respectively, were used to culture triplicate groups for 56 d. The results showed that the 96-hour LC₅₀ value for juvenile *M. rosenbergii* under carbonate alkalinity stress was 17.955 mmol/L, with a safe concentration of 5.118 mmol/L. The survival, weight gain, and specific growth rates of juveniles decreased with increasing alkalinity concentrations, with significant reductions observed in the C9 group compared with the other experimental groups ($P<0.05$). The feed conversion ratio in the C9 group was significantly higher than that in the other experimental groups ($P<0.05$). Compared with the control group, carbonate alkalinity in the C6 and C9 groups significantly inhibited the spawning and egg incubation rates of adult prawns ($P<0.05$). Transmission electron microscopy revealed that the structural integrity of the intestinal microvilli in juvenile prawns deteriorated with increasing carbonate alkalinity stress, with the most severe damage observed in the C9 group. Furthermore, the present study found that the intestinal peritrophic membrane structure of juvenile prawns was damaged by a higher concentration of carbonate alkalinity; and the peritrophic matrix structure of prawns in the C9 group using scanning electron microscopy technology showed increased damage and enlarged pore sizes under carbonate alkalinity stress. Alpha diversity analysis of the intestinal microbiota of juvenile prawns using Illumina MiSeq high-throughput sequencing showed that the flora richness index Chao1 in the C9 group had no significant difference from that of the control group ($P>0.05$), but was significantly higher than that of C3 and C6 groups ($P<0.05$). There was no significant difference in Shannon and Simpson intestinal flora diversity index among all experimental groups ($P>0.05$). Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes dominated the bacterial communities of juvenile *M. rosenbergii* at the phylum level. At the genus level, the abundances of the pathogenic bacteria *Flavobacterium* and *Pseudomonas* in the C9 group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), suggesting that changes in the gut microbiota structure of juvenile *M. rosenbergii* exhibit an increased risk of disease outbreaks. These results suggested that chronic higher concentrations of carbonate alkalinity stress significantly affect the growth performance and reproductive and intestinal histology of juvenile prawns and disrupt the intestinal microbial community structure. Our study highlights that *M. rosenbergii* juveniles are suitable for large-scale saline-alkaline aquaculture in China.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; carbonate alkalinity; growth; peritrophic matrix; intestinal microbiota; saline alkali water

Corresponding author: SUN Shengming. E-mail: sunshengming621416@163.com