

DOI: 10.12264/JFSC2024-0404

α -酮戊二酸对碳酸盐碱暴露下鲫的抗氧化酶、消化酶活性和肠道菌群的影响

韩琳^{1,2}, 刘文质^{1,2}, 袁芳英^{2,3}, 赵岩⁴, 孙言春^{1,2,3*}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 水产品质量安全风险评估实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 哈尔滨理工大学材料科学与化学工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150081;
4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为探究碳酸盐碱暴露下 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, AKG)对鲫(*Carassius auratus*)抗氧化酶、消化酶活性和肠道菌群的调控机制, 本研究结合生化分析与 16S rRNA 测序技术, 设计了 5 个实验组: 淡水组(C 组)、两种盐碱暴露组(20 mmol/L NaHCO₃, T 组; 40 mmol/L NaHCO₃, F 组), 以及两种 AKG 调控组(20 mmol/L NaHCO₃, TA 组; 40 mmol/L NaHCO₃, FA 组)。研究结果表明, 随着碳酸盐碱浓度的增加, 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性显著降低, 丙二醛(MDA)含量显著升高。此外, 鲫肠道的消化酶(淀粉酶 AMS、胰蛋白酶 CHY、脂肪酶 LPS)活性亦出现不同程度的下降。外源补充 AKG 后, 鲫肠道的抗氧化酶和消化酶活性得到了显著恢复, 丙二醛(MDA)含量显著降低。与 C 组相比, T 组和 F 组的变形菌门(Proteobacteria)丰度显著增加, 而厚壁菌门(Firmicutes)的丰度显著下降; T 组和 F 组的优势菌属分别为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanellaceae*)。然而, 在 AKG 调控组(TA 组和 FA 组)中, 变形菌门(Proteobacteria)丰度大幅下降, 厚壁菌门(Firmicutes)的丰度上升, TA 组的优势菌属转为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 而 FA 组的优势菌属仍然为希瓦氏菌属(*Shewanellaceae*)。综上所述, 本研究发现碳酸盐碱暴露导致了鲫肠道氧化应激反应, 并削弱了肠道菌群中有益菌的丰度; 补充 AKG 能够通过增强抗氧化酶和消化酶活性, 调节肠道有益菌群的组成, 有效缓解碳酸盐型盐碱生境对鲫的毒性作用。本研究为鱼类适应盐碱水环境所需的肠道修复型营养功能饲料的精准调控与创制提供了理论和数据支撑, 为提高盐碱水资源的利用效率开拓了新的实践思路。

关键词: α -酮戊二酸; 碳酸盐碱; 鲫; 抗氧化酶; 消化酶; 肠道菌群

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)06-0824-13

在全球变暖及工业化活动等自然和人为因素的双重影响下, 淡水资源日益稀缺, 导致盐碱化程度日益加剧, 开发和利用盐碱水已成为全球环境面临的重大挑战^[1]。我国盐碱水面积约 4600 万 hm², 广泛分布于西北内陆、东北和华北等地区^[2]。盐碱水域的高 pH 和高碳酸盐碱度等水质特征是限制水产增养殖的主要因素, 这使得大多数盐碱水

域尚未得到有效开发和利用^[3]。研究表明, 过高的盐碱浓度会引发水生动物的组织损伤, 导致氧化应激、免疫失衡, 甚至诱发细胞凋亡^[4-6]。因此, 如何修复水生生物靶器官的组织损伤, 逐渐成为盐碱水资源有效利用的研究重点之一。

现有研究表明, 饲料中添加剂的补充能够显著提升鱼类的生长、免疫力和生理健康, 从而减

收稿日期: 2024-12-31; 修订日期: 2025-01-24.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金杰出青年学者项目(JQ2023C007); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD60); 中国博士后科学基金面上项目(2023T160720); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202304M).

作者简介: 韩琳(2002-), 女, 硕士, 研究方向为代谢生理学. E-mail: hanlin200112@163.com

通信作者: 孙言春, 研究员, 研究方向为水生动物抗逆生长代谢组学及代谢生理学. E-mail: sunyc2004@163.com

轻环境胁迫带来的损害。例如, 膳食补充辅酶Q10可有效保护大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)免受氧化鱼油诱导的应激反应^[7]; 硒纳米颗粒^[8]和美羽软粒藻^[9]能增强罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的免疫力和抗氧化能力, 改善生长性能, 缓解由病原菌引起的感染, 从而提高存活率; Meng等^[10]研究发现, 生姜多糖的添加能够调节碳酸盐碱胁迫下鲫(*Carassius auratus*)的免疫功能和肠道菌群, 从而有效缓解应激反应。作为三羧酸(TCA)循环中的关键中间体, α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, AKG)具有抗氧化和抗炎的特性, 同时也在碳代谢和氮代谢之间起到桥梁作用^[11]。已有研究主要关注外源性补充AKG对鲤(*Cyprinus carpio*)^[12-13]和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[14]的生长性能以及免疫反应的促进作用, 但其在碳酸盐碱环境中修复水生生物靶器官氧化损伤以及调节肠道菌群组成的研究尚显匮乏。

鲫(*Carassius auratus*)作为我国重要的淡水经济养殖种类, 具有生长迅速、适应性强等优点, 广泛用于研究全氟和多氟烷基物质(PFAS)^[15]、溴氰菊酯(DE)^[16]、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)^[17]等环境污染物对机体毒性影响机制, 也成为研究淡水鱼盐碱适应机制的理想模型。肠道作为与外界环境接触面积最大的器官, 能快速响应环境压力, 并在消化吸收、免疫防御等方面发挥关键作用^[18]。鱼类肠道微生物群落在维持宿主健康和促进正常生长方面具有重要意义, 这些微生物群落受宿主遗传、饮食结构等因素的影响^[19], 并对外部压力源如温度、盐度等极为敏感, 失调时可影响机体正常的生理机能^[20]。本研究通过生化分析结合肠道微生物组技术, 探讨了外源补充AKG对不同碳酸盐碱浓度下鲫肠道抗氧化酶、消化酶活性以及肠道菌群的调节机制, 为开发鱼类适应碳酸盐碱环境所需的肠道修复型营养功能饲料提供理论和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

基础饲料选用鲫膨化配合饲料, 购自山东通威饲料有限公司。具体成分和AKG配比参照笔

者之前的实验方案^[21]。

1.2 实验设计与实验动物

实验所用松浦银鲫[(130 $\pm$ 5.2) g]由中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰实验站提供。在实验开始前, 所有实验鱼均在盛有新鲜脱氯水的室内循环池(200 L, 100 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm)中适应环境两周。选用健康、规格均匀、体况良好的个体, 随机分为5个处理组: 1个淡水对照组(C组), 2个20 mmol/L NaHCO₃暴露组(T组、TA组), 2个40 mmol/L NaHCO₃暴露组(F组、FA组)。每个处理组设置3个平行组, 每个平行组包含20尾鱼。NaHCO₃的浓度设定依据笔者前期实验并参考中国水生生态系统高盐碱水域的数据^[22]。暴露实验开始当天, 准确测量各组实验个体的初始体长和初始体重。为避免鲫在暴露实验过程中出现急性应激反应, NaHCO₃浓度从初始水质起以每天5 mmol/L的速度逐渐升至实验浓度20 mmol/L和40 mmol/L。

经过7 d适应期后, 开始为5个处理组实验鲫投喂不同浓度的AKG试验饲料, 持续30 d。具体实验分组为: 投喂基础饲料的淡水组设置为C组; 投喂基础饲料的20 mmol/L NaHCO₃暴露组设置为T组; 投喂1.0% AKG饲料的20 mmol/L NaHCO₃暴露组设置为TA组; 投喂基础饲料的40 mmol/L NaHCO₃暴露组设置为F组; 投喂1.0% AKG饲料的40 mmol/L NaHCO₃暴露组设置为FA组。每日投喂饲料量为鱼体重的3%。在饲养过程中, 严格遵循三定三巡原则(定时、定点、定量投喂; 早中晚巡查), 每日8:30和17:00分别投喂1次, 每次投喂30 min后清理残饵和粪便, 确保水质不受污染。实验期间, 水温控制在(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 溶解氧维持在 >6.5 mg/L, 氨氮浓度控制在 <0.6 mg/L。C组的pH约为7.3, T组和TA组pH约为8.6, F组和FA组pH约为9.2。每2天换水1/3。使用酸碱滴定法监测NaHCO₃浓度, 确保20 mmol/L的NaHCO₃暴露组碱度维持在(20 $\pm$ 1) mmol/L, 40 mmol/L的NaHCO₃暴露组碱度维持在(40 $\pm$ 2) mmol/L。采样前24 h禁食, 从每个处理组随机抽取8尾鱼, 使用100 mg/L间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐溶液(MS-222)将鲫深度麻醉。麻

醉后,迅速在冰上采集完整肠道样本,并剪取肠道内的内容物,存放入 2 mL 冻存管中,随即转移至液氮中冷冻保存,所有样品将在采样完成后 24 h 内存放于 -80°C 冰箱中,待后续分析。

1.3 实验仪器与试剂

使用的仪器和试剂如下:分析天平(XS205DY, Mettler Toledo 公司);台式离心机(Allegra X-30R, Beckman 公司);全波长酶标仪(SpectraMax Plus 384, Molecular Devices 公司);冷冻型高通量组织研磨器(SCIENTZ-48L, SCIENTZ 公司);微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo 公司); α -酮戊二酸(AKG, HPLC $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司);间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222, Sigma-Aldrich 公司);碳酸氢钠(分析纯,天津市东丽区天大化学试剂厂)。

1.4 生长指标测定

暴露开始与结束时统计各组实验个体的数量,测定鲫的体重和体长,计算其成活率、增重率、特定生长率,计算公式如下所示:

成活率(survival rate, SR, %)=终末尾数/初始尾数 $\times 100\%$;

增重率(weight gain rate, WGR, %)=(末均重-初均重)/初均重 $\times 100\%$;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=($\ln$ 末均重- $\ln$ 初均重)/饲养天数 $\times 100\%$ 。

1.5 抗氧化酶与消化酶指标测定

将 -80°C 保存的肠道组织样品置于 4°C 解冻后,称取 100 mg 肠道组织,加入 900 μL 生理盐水,在 4°C 、2500 r/min 下离心 10 min,采集上清液进行相关酶活性指标的测定。所测定的抗氧化酶包括:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA);消化酶包括:淀粉酶(AMS)、胰蛋白酶(CHY)、脂肪酶(LPS)。以上六种指标测定的试剂盒均来自南京建成生物工程研究所,测定方法遵循试剂盒说明书进行。

1.6 肠道微生物分析

采用 E.Z.N.A. Soil Kit (Omega U.S.) 试剂盒抽提肠道样品中的总 DNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提质量。DNA 浓度和纯度通过 NanoDrop 2000 测定。合成引物 338F (5'-ACTCCTACGGG

AGGCAGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3') 用于扩增和纯化 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域。文库构建和高通量测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序后,使用 UPARSE 软件按照 97% 相似性对所有序列进行聚类分析,获得操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。Alpha 多样性指数通过 mothur 软件计算,KEGG 功能预测使用 PICRUST 软件完成。采用 LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) 分析方法,确定不同两组间从门到属水平上丰度差异显著的细菌类群。

1.7 数据分析

数据分析使用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 27 软件,采用单因素方差分析(ANOVA)评估 C 组、T 组、TA 组、F 组和 FA 组之间的差异显著性。结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,星号(*)表示各处理组间具有显著性差异,具体定义为:*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 生长指标变化

在暴露过程中,实验设置的浓度并非超高盐碱浓度,理论上不会引起鱼类死亡,并且在暴露过程中未发现鱼类死亡,因此各组的成活率均为 100%。由表 1 可知,与 C 组相比,各组的增重率发生显著变化($P < 0.05$)。随着碳酸盐碱浓度的升高,两个暴露组中鲫的增重率和特定生长率均呈显著下降趋势。其中,与 C 组相比,T 组和 F 组的增重率分别下降了 27.72% 和 38.46%,特定生长率分别下降了 0.62%/d 和 0.90%/d ($P < 0.05$)。补充 AKG 后,鲫的增重率和特定生长率均有显著增加($P < 0.05$):与 T 组相比,TA 组的增重率提高了 18.63%,特定生长率提高了 0.43%/d;与 F 组相比,FA 组的增重率提高了 21.21%,特定生长率提高了 0.53%/d。

2.2 抗氧化酶活性变化

如图 1a 和 1b 所示,SOD 和 CAT 活性与碳酸盐碱浓度呈显著负相关。与 C 组相比,T 组的 SOD 活性降低了 21.8%,CAT 活性降低了 18.8%;F 组的 SOD 活性降低了 29.4%,CAT 活性降低了

27.7%。外源补充 AKG 后, 二者的活性均有所提升: 与 T 组相比, TA 组的 SOD 活性升高了 11.4%, CAT 活性升高了 14.8%; 与 F 组相比, FA 组的 SOD 活性升高了 21.5%, CAT 活性升高了 27.2%。TA 组的 CAT 和 AMS 活性以及 MDA 含量与 C 组有显著差异($P<0.05$), FA 组的 SOD 和 CAT 活性以及 MDA 含量也均与 C 组有显著差异($P<0.05$)。随

着碳酸盐碱浓度的升高, T 组和 F 组的 MDA 含量显著增加。与 T 组相比, TA 组的 MDA 含量显著降低了 13.6%; 与 F 组相比, FA 组的 MDA 含量显著降低了 8.2% (图 1c)。

2.3 消化酶活性改变

在碳酸盐碱暴露下, 模型组(T 组、F 组)的 AMS 活性与对照组相比显著降低, 分别降低了

表 1 α -酮戊二酸(AKG)对鲫生长指标的影响
Tab. 1 Effects of α -ketoglutarate (AKG) on growth indicators of *Carassius auratus*

组别 group	初始体重/g initial weight	终末体重/g final weight	增重率/% weight growing rate, WGR	特定生长率/(%/d) specific growth rate, SGR
C	63.17±0.06 ^a	103.55±0.05 ^a	63.92±0.26 ^a	1.65±0.03 ^a
T	62.99±0.12 ^a	85.79±0.10 ^d	36.20±0.12 ^d	1.03±0.00 ^d
TA	62.87±0.05 ^a	96.00±1.61 ^b	54.83±0.05 ^b	1.46±0.07 ^b
F	62.94±0.05 ^a	78.98±0.13 ^e	25.46±0.25 ^e	0.75±0.03 ^e
FA	62.92±0.04 ^a	92.28±0.21 ^c	46.67±0.08 ^c	1.28±0.09 ^c

注: 同行数据上标小写字母表示不同组间有显著差异($P<0.05$).
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

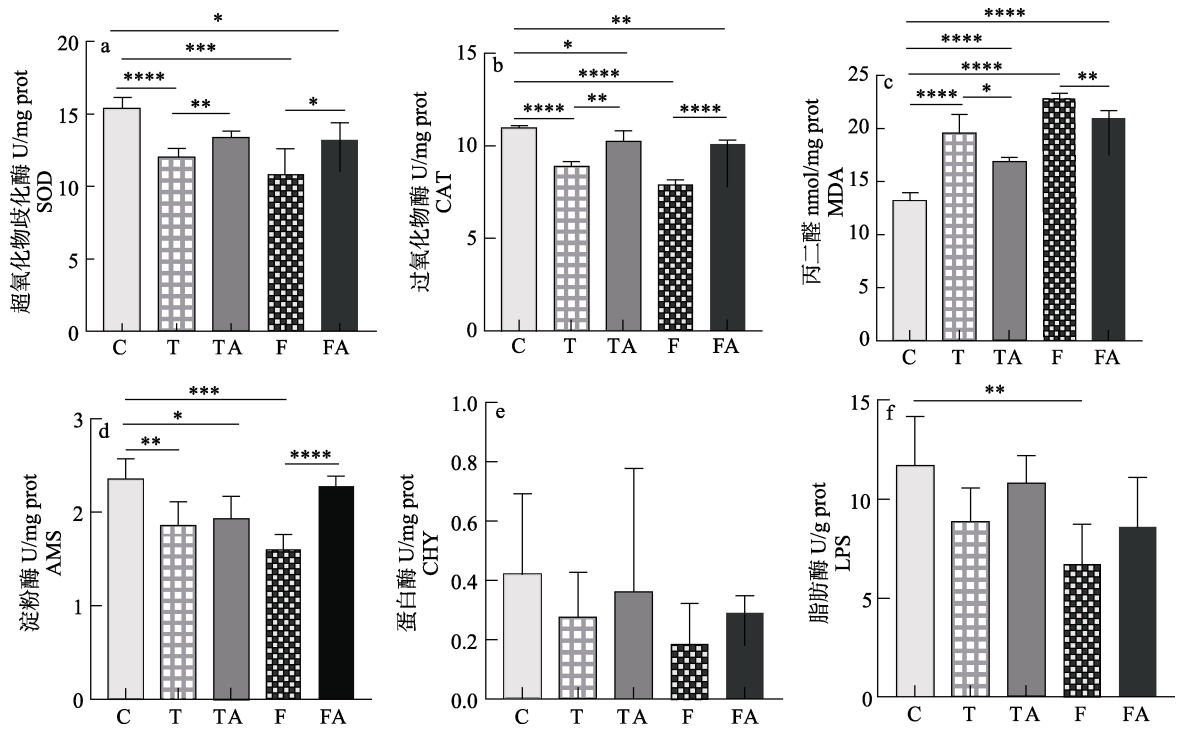


图 1 α -酮戊二酸(AKG)对鲫肠道生化指标的影响

a. 超氧化物歧化酶; b. 过氧化物酶; c. 丙二醛; d. 淀粉酶; e. 蛋白酶; f. 脂肪酶. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$. C 为淡水组; T 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露组; TA 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组; F 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露组; FA 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组.

Fig. 1 Effects of α -ketoglutarate (AKG) on intestinal biochemical indicators of *Carassius auratus*
a. Superoxide dismutase; b. Catalase; c. Malondialdehyde; d. Amylase; e. Chymotrypsin; f. Lipase.

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$. C is freshwater group; T is 20 mmol/L NaHCO_3 exposure group; TA is 20 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group; F is 40 mmol/L NaHCO_3 exposure group; FA is 40 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group.

21.2%和 31.8%。与 F 组相比, FA 组的 AMS 活性显著升高了 41.6% (图 1d)。CHY 活性与 AMS 的变化趋势相似, 但各组间无显著差异($P>0.05$, 图 1e)。LPS 活性呈现类似趋势, 随着碳酸盐碱浓度升高, T 组和 F 组的 LPS 活性逐渐降低, 与 C 组相比, F 组的 LPS 活性显著降低了 42.6%。与 T 组和 F 组相比, 两个 AKG 调控组(TA 组和 FA 组)的 LPS 活性均有所升高, 其余组别之间无显著差异($P>0.05$, 图 1f)。

2.4 肠道微生物研究

2.4.1 肠道微生物的丰富度和多样性

稀释曲线接近平缓, 表明测序数量能够进行后续肠道微生物多样性分析的要求(图 2a)。 β -多样性分析通过主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)研究各组间肠道微生物群落的组成差异。PCoA

结果显示, 在碳酸盐碱暴露下, 模型组(T 组、F 组)和调控组(F 组、FA 组)的样本与对照组明显分离, 这表明 β -多样性受到了显著影响(图 2b)。 α -多样性通过 ACE、Shannon 和 Sobs 指数来反映群落的丰富度和多样性, 结果显示(图 2c~2e), 碳酸盐碱暴露后, ACE、Shannon 和 Sobs 指数均下降, 具体表现为: 与 C 组相比, T 组的 ACE 指数下降 82.8%, Shannon 指数下降 21.8%, Sobs 指数下降 77.9%; F 组的 ACE 指数下降 67.9%, Shannon 指数下降 16.9%, Sobs 指数下降 61.6%。外源补充 AKG 后, 这 3 个指数均有所上升: 与 T 组相比, TA 组的 ACE 指数上升 521.0%, Shannon 指数上升 45.8%, Sobs 指数上升 480.9%; 与 F 组相比, FA 组的 ACE 指数上升 38.1%, Shannon 指数下降 28.9%, Sobs 指数上升 23.8%。

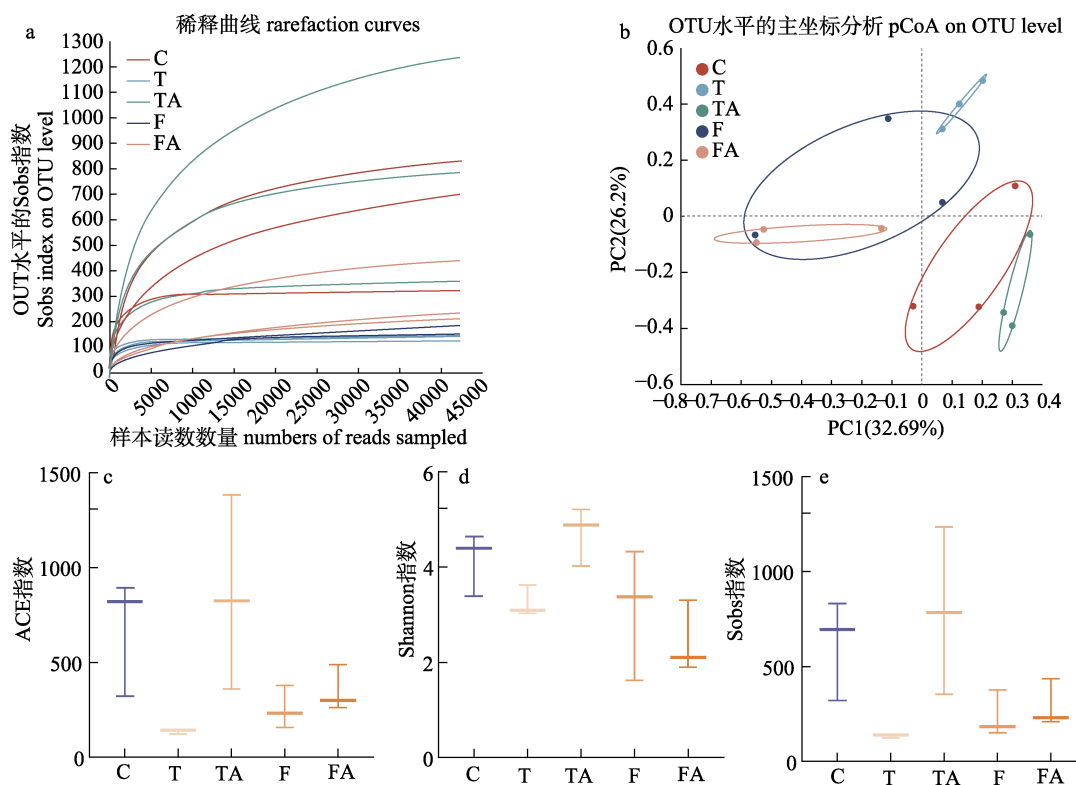


图 2 AKG 对鲫肠道微生物多样性的影响

a. 稀释曲线; b. PCoA 分析; c. ACE 指数; d. Shannon 指数; e. Sobs 指数。

C 为淡水组; T 为 20 mmol/L NaHCO₃ 暴露组; TA 为 20 mmol/L NaHCO₃ 暴露 AKG 调控组;

F 为 40 mmol/L NaHCO₃ 暴露组; FA 为 40 mmol/L NaHCO₃ 暴露 AKG 调控组。

Fig. 2 Effects of AKG on intestinal microbial diversity of *Carassius auratus*

a. Rarefaction curve; b. PCoA analysis; c. ACE index; d. Shannon index; e. Sobs index.

C is freshwater group; T is 20 mmol/L NaHCO₃ exposure group; TA is 20 mmol/L NaHCO₃-AKG regulatory group;

F is 40 mmol/L NaHCO₃ exposure group; FA is 40 mmol/L NaHCO₃-AKG regulatory group.

2.4.2 肠道微生物的结构和组成 图 3a 展示了门水平上排名前十的微生物群落。在门水平上,不同处理组的肠道微生物群落结构相似,但优势菌门丰度不同。C 组的主要菌门包括变形菌门(39.3%)、厚壁菌门(24.3%)、疣微菌门(11.7%)和放线菌门(6.3%)。T 组以变形菌门为主,丰度超过 90%; F 组的主要菌门为变形菌门(76.4%)、梭杆菌门(7.0%)和放线菌门(6.7%)。TA 组主要由变形菌门(34%)、厚壁菌门(18.6%)和放线菌门(15.2%)构成; FA 组主要由变形菌门(70%)、厚壁菌门(12.1%)和梭杆菌门(10.0%)组成。与 T 组和 F 组相比,外源补充 AKG 显著降低了碳酸盐碱暴露后肠道微生物中变形菌门的丰度(F 组、FA 组)。

在属水平上, C 组的优势属是衣原体属(8.9%); T 组的优势菌属是鞘氨醇单胞菌(13.3%); TA 组的优势菌属为芽孢杆菌(9.3%); F 组(23.7%)和 FA 组

(26.2%)的优势菌属是希瓦氏菌属(图 3b)。在 F 组和 FA 组中, 鲸杆菌属的丰度较高(7.0%, 10.9%), F 组和 FA 组还包含气单胞菌属(9.8%, 12.6%)。

通过 LEfSe 软件对 5 组肠道菌群样本进行线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)(图 4a), 共识别出 35 个微生物群落在各组之间存在显著差异。C 组有副衣原体科、红杆菌目、红细菌科、芽殖杆菌属等 10 类群, T 组有变形菌门、假单胞菌目、黄色杆菌科等 4 个类群, TA 组有芽孢杆菌科、类芽孢杆菌属、绿弯菌门、热微菌目等 10 个类群, F 组有伍氏束菌属 1 类, FA 组有等变形菌纲、希瓦氏菌属、交替单胞菌目、糖多孢菌 10 个类群。使用 PICRUSt2 预测肠道菌群的功能(图 4b), 主要涉及能量代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、脂质代谢和免疫功能等多个生理过程。

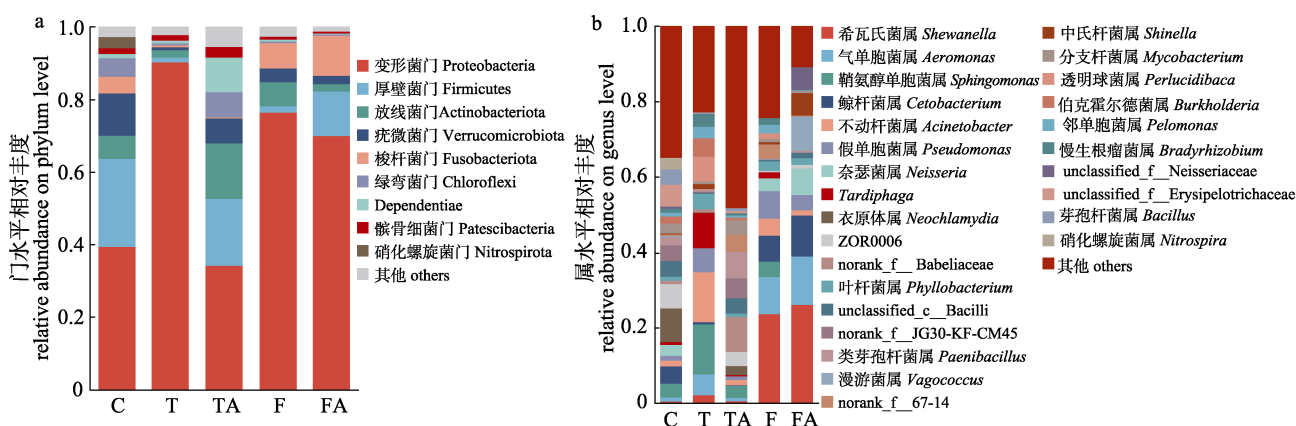


图 3 鲫肠道菌群门、属水平相对丰度

a. 门水平相对丰度; b. 属水平相对丰度. C 为淡水组; T 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露组; TA 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组; F 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露组; FA 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组。

Fig. 3 Relative abundance of intestinal microbiota of *Carassius auratus* at phylum and genus level

a. Relative abundance on phylum level; b. Relative abundance on genus level. C is freshwater group; T is 20 mmol/L NaHCO_3 exposure group; TA is 20 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group; F is 40 mmol/L NaHCO_3 exposure group; FA is 40 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group.

3 讨论

随着全球水产品需求量的增加与淡水资源的日益枯竭, 盐碱水资源逐渐成为研究的焦点, 盐碱水增养殖也因此成为各国研究者日益关注的课题^[21]。作为三羧酸循环中的关键中间产物, AKG 不仅是谷氨酰胺、精氨酸等的前体物质, 还广泛

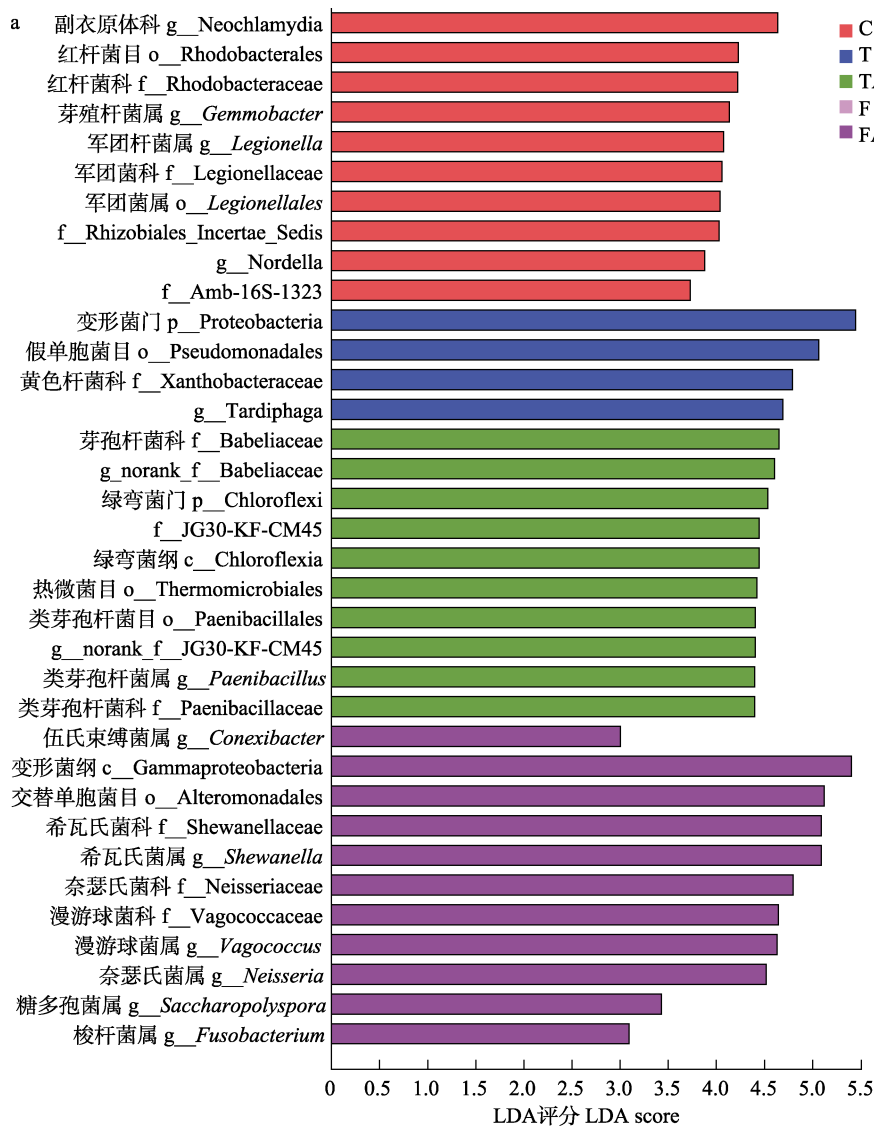
参与能量代谢和氨基酸代谢等生理反应^[23]。然而外源补充 AKG 对碳酸盐碱暴露下淡水鱼类肠道氧化应激损伤的修复作用及肠道微生物调节作用的研究较为稀缺。本研究结合生化指标和肠道微生物组, 对淡水组、 NaHCO_3 暴露组和 AKG 调控组进行对比分析, 结果表明, 饲料中补充 AKG 可以显著缓解鲫因碳酸盐碱暴露引起的肠道氧化应

CAT 活激, 并调节肠道微生物群的组成。

3.1 AKG 缓解碳酸盐碱暴露导致的鲫肠道氧化应激损伤

环境胁迫可诱导水生动物产生活性氧(ROS), 进而引发氧化应激反应^[24]。为减轻氧化应激的有害影响, 生物体会启动抗氧化防御系统, 其中 SOD-CAT 防御体系是其中的关键组成部分, 也是抵御氧化损伤的第一道防线, 参与维持机体氧化还原平衡, 保护细胞免受氧化应激的伤害^[25]。活性氧的前体, 即超氧阴离子(O_2^-), 首先通过 SOD 转化为过氧化氢(H_2O_2)^[26], 随后由 CAT 分解产生分子氧和水^[27]。过量的 ROS 会攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化, MDA 作为脂质

过氧化的标志物, 其含量的增加通常被用作氧化损伤严重程度的指示^[28]。AKG 以其抗氧化特性, 能够清除体内过量的 ROS, 缓解氧化应激, 维持机体氧化还原平衡^[29]。Shang 等^[30]在研究盐碱暴露对大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)影响时发现, 盐碱暴露后大鳞鲃体内 SOD 和 CAT 活性显著下降, 同时 MDA 含量显著上升。同样, 关于虾青素对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)氧化应激损伤抑制的研究表明, 高碱度应激引发了脊尾白虾的氧化应激, 导致 SOD 和 CAT 活性降低, MDA 含量增加; 补充虾青素后, SOD 和 CAT 活性显著提高, MDA 含量降低^[31]。这一发现与本研究结果一致: 在碳酸盐碱暴露下, T 组和 F 组鲫的 SOD 和



(待续 to be continued)

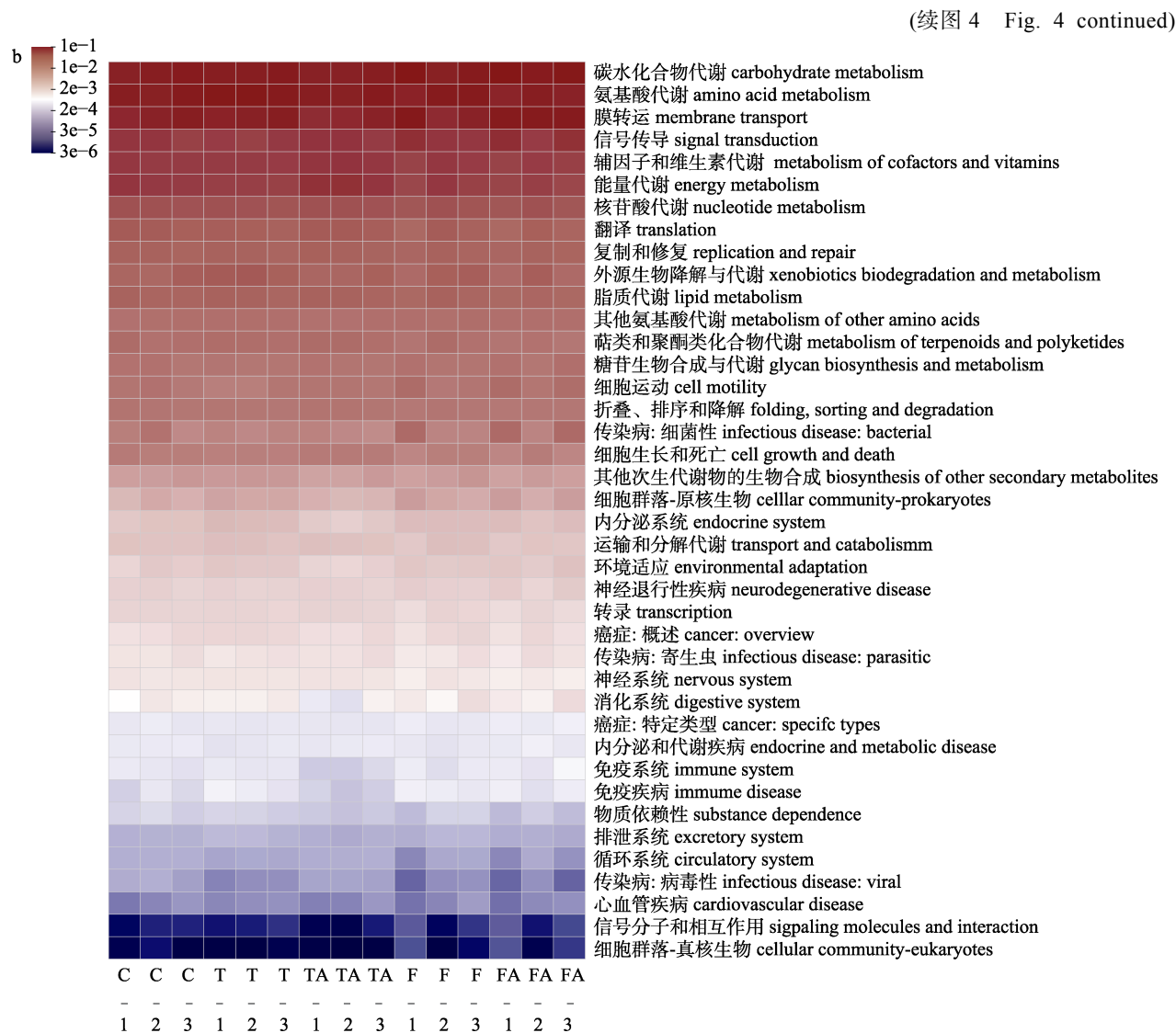


图 4 鲫肠道菌群 LEfSe 分析和 PICRUSt2 预测

a. LEfSe 分析; b. PICRUSt2 功能预测. C 为淡水组; T 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露组; TA 为 20 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组; F 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露组; FA 为 40 mmol/L NaHCO_3 暴露 AKG 调控组.

Fig. 4 LEfSe analysis and PICRUSt2 function prediction of intestinal microbiota of *Carassius auratus*

a. LEfSe analysis; b. PICRUSt2 function prediction. C is freshwater group; T is the 20 mmol/L NaHCO_3 exposure group; TA is 20 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group; F is the 40 mmol/L NaHCO_3 exposure group; FA is 40 mmol/L NaHCO_3 -AKG regulatory group.

性均显著降低,而MDA含量均显著上升,推测可能是长期盐碱暴露导致鲫肠道内 ROS 大量积累,内源性抗氧化防御系统未能完全清除 ROS,导致 SOD 和 CAT 活性受到抑制甚至失活。AKG 能够中和碳酸盐碱暴露后鲫体内的过量氧自由基,抑制脂质过氧化,是抑制氧化应激的重要抑制因子。AKG 可能通过降低 MDA 水平,增强抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性,从而提高鲫肠道的抗氧

化能力,缓解碳酸盐碱暴露引起的氧化应激。因此调控组(TA 组、FA 组)中 SOD 和 CAT 活性显著提高,MDA 含量显著降低,这表明酶促抗氧化防御系统的增强。此结果与 AKG 提高尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)体内的抗氧化酶活性^[14,32]和生麦多糖增强鲫(*Carassius auratus*)体内抗氧化防御系统^[10]的研究结果一致,与本研究不同的是,AKG 通过增

强草鱼 γ -GT (γ -Glutamyl transpeptidase)酶活性和降低血红蛋白的含量来改善肠道的抗氧化功能。

3.2 AKG 增强鲫肠道消化酶活性

肠道作为鱼体与外界环境接触最广泛的器官,承担着重要的保护功能,主要通过物理屏障(如黏膜、上皮细胞等)、化学屏障(如糖蛋白、消化酶等)、微生物屏障(由肠道菌群构成)以及免疫屏障(由淋巴组织、细胞因子等组成)^[33-34]发挥作用。消化酶活性作为鱼类消化生理机能和健康状况的重要指标,受 pH、盐度、饲料营养结构等多种因素的影响^[35]。不同类型的消化酶在鱼类对各种营养物质的消化吸收过程中发挥关键作用,淀粉酶催化糖原、淀粉及其部分水解产物的水解反应,脂肪酶则促进胆固醇、磷脂等底物中酯键的水解,蛋白酶主要催化蛋白质的水解反应,因此消化酶的活性直接反映了鱼类的消化能力^[36]。Shang 等^[37]研究了盐碱暴露对尼罗罗非鱼营养加工的影响,发现 14、28、42 mmol/L NaHCO_3 处理组的胰淀粉酶活性均显著低于淡水组。类似的研究也表明,当水中碳酸盐碱度超过 10 mmol/L 时,松浦镜鲤的肠道内淀粉酶和脂肪酶的活性显著低于碳酸盐碱度为 0 mmol/L 的对照组^[38]。这些发现与本研究结果高度一致。本研究中,随着碳酸盐碱浓度的升高,鲫肠道内 CHY、AMS、LPS 活性出现不同程度的下降。由此推测,当 NaHCO_3 浓度达到 20 和 40 mmol/L 时,暴露组的 pH 已超出鲫消化酶的最适 pH 范围,导致消化酶活性显著降低。然而,外源补充 AKG 后,两个调控组(TA 组、FA 组)中 CHY、AMS、LPS 的活性均显著增强,鲫肠道内营养物质的运输得到改善,碳水化合物、蛋白质等营养成分的吸收也得到增强,因此 TA 组和 FA 组的增重率和特定生长率均有所提高。这与 AKG 改善幼年镜鲤的生长性能的研究结果相似^[12],不同的是 AKG 通过增加幼年镜鲤的采食量和磷摄入量来促进其生长。本研究结果表明,AKG 能有效调节肠道消化酶的活性,缓解盐碱环境对鱼类消化系统的负面效应,进而改善其生长性能。

3.3 AKG 促进鲫有益肠道菌群的形成

肠道微生物群落是衡量水生动物肠道健康的

重要指标,其组成和稳定性在调节宿主的营养代谢和免疫功能中发挥着关键作用^[39]。肠道微生物与宿主之间存在着复杂的相互作用:一方面,微生物能够高效地吸收和代谢营养物质;另一方面,宿主的营养状态也会对微生物的代谢活动产生影响^[40]。在鱼类中,变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门是常见的优势菌群^[41],其中变形菌门通常包含多种致病菌属,常被视为微生态失调的标志^[42]。本研究的 PCoA 分析显示,2 个暴露组(T 组和 F 组)与 2 个调控组(TA 组和 FA 组)的肠道微生物样本分布在不同的区域,这表明碳酸盐碱暴露和外源补充 AKG 显著改变了鲫肠道微生物的组成。与 C 组相比,盐碱暴露后,T 组和 F 组中变形菌门的丰度显著增加。由于变形菌门的丰度与宿主健康状况呈负相关,这一现象可能表明盐碱环境使鲫患病的概率增加,而饮食结构是影响肠道菌群组成的关键因素。因此,外源补充 AKG 后,T 组的变形菌门丰度显著降低,这表明 AKG 可能通过调节肠道微生物群落来减缓盐碱环境对鲫健康的负面影响。厚壁菌门在维持肠道屏障稳定性和合成短链脂肪酸(如丁酸盐)方面起着至关重要的作用,丁酸盐对调节肠道菌群结构和维持宿主免疫稳态方面至关重要^[43]。放线菌门在改善鱼类的营养代谢和免疫功能方面也起到了积极作用,有助于维持肠道稳态^[44-45]。梭杆菌门通常被认为是有益菌群,其通过向机体提供维生素或产生对机体有益的代谢产物(如丙酮酸和丁酸等),促进肠道代谢进而参与维持肠道菌群的稳态^[46]。本研究发现,AKG 补充后鲫肠道中厚壁菌门、放线菌门以及梭杆菌门的丰度均有所增加,推测 AKG 作为 TCA 循环的重要中间产物,能够为肠道微生物提供重要的能量来源,通过维持最佳肠道功能来促进肠道微生物的生长,进而平衡肠道稳态。与此同时,TA 组和 FA 组在门水平构成上主要差别在放线菌门和梭杆菌门,两种菌门能通过不同的方式起到维持肠道稳态的作用,且放线菌门的丰度高于梭杆菌门,推测 AKG 对 T 组的微生物修复程度大于对 F 组的微生物修复程度。

在盐碱环境中,鲫肠道的鞘氨醇单胞菌属逐

渐形成了盐碱耐受性基因,以适应不利环境^[47]。此外,芽孢杆菌作为一种有益菌,通过产生抑制性化合物和增强免疫功能来帮助宿主抵抗疾病^[48]。在本研究中,TA 组的优势菌属为芽孢杆菌,表明外源补充 AKG 促进了鲫肠道有益菌的形成,从而增强鲫肠道的免疫功能,帮助其维持肠道健康。然而,作为潜在病原体的希瓦氏菌属可能引起水生动物感染和炎症反应^[49]。我们观察到,在高盐碱浓度组,F 组和 FA 组的优势菌属均为希瓦氏菌属,推测盐碱环境中的过量 ROS 可能导致更多的过氧化产物生成,机体的抗氧化防御系统未能及时清除 ROS,从而增加了炎症反应的风险。该结果与盐碱暴露后 MDA 含量上升的观测结果一致。AKG 促进了低盐碱暴露组(T 组)有益菌的形成,而对高盐碱暴露组(F 组)微生物的修复程度有限,因此 TA 组的优势菌属为芽孢杆菌属,FA 组的优势菌属仍为希瓦氏菌属。功能预测结果(通过 PICRUSt2 分析)显示,盐碱暴露后鲫肠道的消化系统和免疫系统功能丰度显著降低,而感染寄生虫病的丰度略有增加,进一步表明盐碱暴露严重影响了鲫肠道菌群的营养、消化和吸收功能。这一发现与盐碱暴露后消化酶(CHY、AMS、LPS 活性)显著降低的结果相一致,揭示了盐碱暴露破坏了鲫肠道内微生物的正常结构,导致屏障功能减弱,进而增加了免疫疾病和寄生虫感染的风险。

4 结论

本研究结合生化指标测定和 16S rRNA 高通量测序技术,系统探讨了 AKG 对碳酸盐碱胁迫下鲫肠道抗氧化酶、消化酶活性以及微生物群落的调控机制。研究结果表明,碳酸盐碱浓度与抗氧化酶和消化酶活性之间呈负相关,且随着碳酸盐碱浓度的升高,MDA 含量逐渐增加,提示氧化应激和消化功能的损害。AKG 通过增强抗氧化酶和消化酶的活性,显著缓解了碳酸盐碱暴露对鲫肠道的负面影响,改善了肠道微生物菌群的紊乱,促进了有益菌群的形成,并增强了肠道的屏障功能。综上所述,AKG 在改善碳酸盐碱环境下鲫肠道健康方面发挥了重要作用,有助于鲫更好地适应盐碱环境。本研究为淡水鱼类适应碳酸盐碱环

境所需的精准营养调控功能饲料的创制提供了基础理论依据,且对提高盐碱水资源的利用效率具有重要的科学意义和指导价值。

参考文献:

- [1] Wimalagunaratna N D, Dharmarathne G, Ekanayake I U, et al. Effect of endogenous and anthropogenic factors on the alkalisation and salinisation of freshwater in United States by using explainable machine learning[J]. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 2024, 10: 100919.
- [2] Yao M Z, Liu Y J, Li S W, et al. Metabolomics study on gill tissues of *Carassius auratus* gibelio under NaHCO_3 habitat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(6): 792-802. [姚明珠, 刘英杰, 李姗姗, 等. NaHCO_3 生境胁迫下方正银鲫鳃靶器官代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 792-802.]
- [3] Zhou H S, Yao T H, Zhang T X, et al. Effects of chronic saline-alkaline stress on gill, liver and intestinal histology, biochemical, and immune indexes in Amur minnow (*Phoxinus lagowskii*)[J]. Aquaculture, 2024, 579: 740153.
- [4] Zhou F F, Chang M Y, Ruan S J, et al. Transcriptomic and histologic analyses preliminarily reveal the immune-metabolic response mechanism to saline-alkaline in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2024, 52: 101282.
- [5] Li M S, Wang S H, Zhao Z G, et al. Effects of alkalinity on the antioxidant capacity, nonspecific immune response and tissue structure of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fishes, 2022, 7(4): 206.
- [6] Tao S Q, Li X J, Wang J Y, et al. Examination of the relationship of carbonate alkalinity stress and ammonia metabolism disorder-mediated apoptosis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*: Potential involvement of the ROS/MAPK signaling pathway[J]. Aquaculture, 2024, 579: 740179.
- [7] Zhang Y X, Cai L W, Dong Z Y, et al. Evaluation of intervention effects of dietary coenzyme Q10 supplementation on oxidized fish oil-induced stress response in largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 134: 108604.
- [8] Yazhiniprabha M, Gopi N, Mahboob S, et al. The dietary supplementation of zinc oxide and selenium nanoparticles enhance the immune response in freshwater fish *Oreochromis mossambicus* against aquatic pathogen *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2022, 69: 126878.
- [9] Fatima R, Nilofer P S, Karthikeyan K, et al. Enhancement of immune response and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*) by dietary supplementation of *Portieria hornemannii*[J]. Aquaculture, 2022, 547: 737448.
- [10] Meng X W, Luo L, Zhao Z G, et al. Ginger polysaccharide

- alleviates the effects of acute exposure to carbonate in crucian carp (*Carassius auratus*) by regulating immunity, intestinal microbiota, and intestinal metabolism[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 273: 116127.
- [11] Iniguez A B, Du M, Zhu M J. α -ketoglutarate for preventing and managing intestinal epithelial dysfunction[J]. *Advances in Nutrition*, 2024, 15(4): 100200.
- [12] Wang L S, Fan Z, Zhang Y Y, et al. Effect of phosphorus on growth performance, intestinal tight junctions, Nrf2 signaling pathway and immune response of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*) fed different α -ketoglutarate levels[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 120: 271-279.
- [13] Luo Q H, Qian R D, Qiu Z S, et al. Dietary α -ketoglutarate alleviates glycinin and β -conglycinin induced damage in the intestine of mirror carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1140012.
- [14] Lin X, Jin B T, Wang H Q, et al. Effects of diet α -ketoglutarate (AKG) supplementation on the growth performance, antioxidant defense system, intestinal digestive enzymes, and immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(2): 511-524.
- [15] Zhao Y, Wang M Y, Chu W H. Neurotoxicity and intestinal microbiota dysbiosis induced by per- and polyfluoroalkyl substances in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 478: 135611.
- [16] Yuan X P, Wu H, Gao J W, et al. Deltamethrin increased susceptibility to *Aeromonas hydrophila* in crucian carp through compromising gill barrier[J]. *Chemosphere*, 2024, 365: 143379.
- [17] Liu Y J, You S J, Ding L, et al. Hepatotoxic effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on crucian carp: Insights from multi-omics analyses[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 923: 171447.
- [18] Gao J H, Zhao J L, Guo N X, et al. Hepcidin defense patterns in intestine of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) against *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 155: 110003.
- [19] Yu X J, Wu Z H, Luo K, et al. Comparative analysis of intestinal microbiota and its function on digestion and immunity of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* fed two different sources of dietary soybean protein[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2025, 157: 110060.
- [20] Xavier R, Severino R, Silva S M. Signatures of dysbiosis in fish microbiomes in the context of aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2024, 16(2): 706-731.
- [21] Ding L, Liu Y J, Wei X F, et al. Effects of α -ketoglutarate supplementation on serum metabolism of crucian carp under carbonate alkaline stress based on UPLC-Q-TOF/MS metabolomics[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(2): 138-149. [丁璐, 刘英杰, 魏晓凤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术探究 α -酮戊二酸对碳酸盐胁迫下鲫血清代谢的影响[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(2): 138-149.]
- [22] Sun Y C, Han S C, Yao M Z, et al. Exploring the metabolic biomarkers and pathway changes in crucian under carbonate alkalinity exposure using high-throughput metabolomics analysis based on UPLC-ESI-QTOF-MS[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(3): 1552-1571.
- [23] Yang R, Zhang D, Wu L Y, et al. Glutamate and α -ketoglutarate on the growth, deamination, and glucose metabolism of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(3): 384-392. [杨儒, 张冬, 吴璐瑶, 等. 谷氨酸和 α -酮戊二酸对鳊生长、脱氨及糖代谢的影响[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(3): 384-392.]
- [24] Liu Y J, Yao M Z, Li S W, et al. Integrated application of multi-omics approach and biochemical assays provides insights into physiological responses to saline-alkaline stress in the gills of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 822: 153622.
- [25] Mattos L M M, Silva R N, Santos L G, et al. Harnessing H₂O₂-induced susceptibility in *Galleria mellonella* larvae: A robust model for exploring oxidative stress and biomarkers[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2025, 113: 104596.
- [26] Yang J R, Fu Z Y, Yu G, et al. Combined effects of temperature and salinity on antioxidants in the immune system of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Fishes*, 2022, 7(5): 260.
- [27] Wang M X, Li E C, Huang Y X, et al. Dietary supplementation with glutamate enhanced antioxidant capacity, ammonia detoxification and ion regulation ability in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to acute alkalinity stress[J]. *Aquaculture*, 2025, 594: 741360.
- [28] Yu Q R, Zhang F, Li R N, et al. Growth performance, antioxidant capacity, intestinal microbiota, and metabolomics analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under carbonate alkalinity stress[J]. *Aquaculture*, 2025, 595: 741675.
- [29] Pradhan C, Soharwardi U, Dileep N, et al. Suitable ratio of dietary L-carnitine and α -ketoglutarate improves growth and health performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(6): 1933-1950.
- [30] Shang X C, Geng L W, Yang J, et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism of alkalinity exposure on spleen oxidative stress, inflammation and immune function of *Luciobarbus capito*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225: 112748.
- [31] Li W Y, Wang J J, Li J T, et al. The effect of astaxanthin on the alkalinity stress resistance of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 917: 170415.
- [32] Ramakrishnan G S, Pradhan C, Singh A K, et al. Effect of alpha-ketoglutarate supplementation on growth, antioxidant capacity, gene expression and amino acid profile in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under varying protein diets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2023, 306: 115808.
- [33] 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 and Proteomics*, 2023, 45: 101044.
- [34] Liu J, Yan Z H, Yao B L, et al. Research progress on the tissue structure, function, influencing factors and protective substances of fish intestine[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2023, 50(2): 121-127. [刘佳, 闫子豪, 么宝兰, 等. 鱼类肠道组织结构、功能、影响因素及其保护物质的研究进展[J]. *水产科技情报*, 2023, 50(2): 121-127.]
- [35] Guan H H, Long X B, Ding Y, et al. Weaning strategy on survival, growth, intestinal histology, enzyme activity, and liver transcriptome of juvenile yellowcheek carp *Elopichthys bambusa*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(12): 1980-1992. [管赫赫, 龙小波, 丁洋, 等. 驯食策略对鳊鱼存活、生长、肠道组织学与消化酶及肝脏转录组的影响[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(12): 1980-1992.]
- [36] Trivedi S P, Dwivedi S, Trivedi A, et al. Dietary inclusion of *Withania somnifera* and *Asparagus racemosus* induces growth, activities of digestive enzymes, and transcriptional modulation of *MyoD*, *MyoG*, *Myf5*, and *MRF4* genes in fish, *Channa punctatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2024, 271: 110944.
- [37] Song L Y, Zhao Y, Song Y D, et al. Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737036.
- [38] Fan Z, Wu D, Zhang Y Y, et al. Carbonate alkalinity and dietary protein levels affected growth performance, intestinal immune responses and intestinal microflora in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu)[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737135.
- [39] Shao J C, Wang Y J, Wu L W, et al. Evaluation of chicken liver meal as fish meal alternative in large yellow croaker *Larimichthys crocea* diet: Effects of growth performance, antioxidant capacity, intestinal health and microflora, and protein metabolism[J]. *Aquaculture Reports*, 2025, 40: 102536.
- [40] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [41] Zheng J B, Yao Y F, Rui Q L, et al. Effect of different feeding regimens on physiological indicators, intestinal transcriptome, and bacterial flora of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2024, 52: 101301.
- [42] Li M, Liang H, Yang H W, et al. Deciphering the gut microbiome of grass carp through multi-omics approach[J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): Article No.2.
- [43] Stoeva M K, Garcia-So J, Justice N, et al. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1907272.
- [44] Chen W J, Gao S Y, Chang K, et al. Partial fishmeal replacement by soybean meal induces fish growth retardation and gut inflammation via gut mucosal barrier dysfunction and dysbiosis in largemouth bass[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2024, 316: 116067.
- [45] Li J, Xia D M, Jing X F, et al. Addition of solid-state fermentation product of yeast ameliorated the effects of high-fat diet on hepatic lipid metabolism, epidermal mucus, intestine and liver health, and gut microbiota of zebrafish[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 30: 101589.
- [46] Di S S, Li Y, Song B B, et al. Potential effects of individual and combined exposure to tetraconazole and cadmium on zebrafish from the perspective of enantioselectivity and intestinal microbiota[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 921: 170899.
- [47] Liu H, Wei L L, Zhu L F, et al. Research progress of *Sphingomonas*[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(6): 2738-2752. [刘辉, 韦璐璐, 朱龙发, 等. 鞘氨醇单胞菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(6): 2738-2752.]
- [48] Ouyang H F, Deng N N, Xu J C, et al. Effects of hyperosmotic stress on the intestinal microbiota, transcriptome, and immune function of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738901.
- [49] Paździor E. *Shewanella putrefaciens*—a new opportunistic pathogen of freshwater fish[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2016, 60(4): 429-434.

Influence mechanisms of α -ketoglutarate on antioxidant enzyme activity, digestive enzyme activity, and gut microbiota of *Carassius auratus* exposed to carbonate-alkaline stress

HAN Lin^{1,2}, LIU Wenzhi^{1,2}, YUAN Fangying^{2,3}, ZHAO Yan⁴, SUN Yanchun^{1,2,3*}

1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquatic Product Quality and Safety Risk Assessment Laboratory, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

3. School of Materials and Chemical Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150081, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The roles of α -ketoglutarate (AKG) as a supplementary additive have been proved in improving the growth performance and immune response of several carps, while its effects are rarely studied on repairing oxidative damage in target organs of aquatic organisms in carbonate-alkaline environments, as well as the regulation of intestinal microbiota. As a prominent freshwater economic aquaculture species within the Chinese fishery industry, crucian carp (*Carassius auratus*) has good attributes of swift growth and robust adaptability, making it an ideal model for probing into the saline-alkaline adaptation mechanism of freshwater fishes. This study explored the mechanisms by which AKG modulates antioxidant enzymes, digestive enzymes, and intestinal microbiota in crucian carp under carbonate-alkaline stress. Using biochemical analysis and 16S rRNA sequencing, five experimental groups were established: a freshwater control group (group C), two carbonate-alkaline exposure groups (20 mmol/L NaHCO₃, group T; 40 mmol/L NaHCO₃, group F), and two AKG supplementation groups (20 mmol/L NaHCO₃, group TA; 40 mmol/L NaHCO₃, group FA). The experimental crucian carp were exposed to 20 and 40 mmol/L NaHCO₃ for a period of 30 days. Finally, six biochemical indicators and intestinal microbiota of the experimental carps were measured and then analyzed with GraphPad Prism 9.0, principal co-ordinates analysis (PCoA), and linear discriminant analysis (LDA). The results showed that with increasing carbonate-alkaline concentration, the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) significantly decreased, while malondialdehyde (MDA) content increased. Moreover, the activities of digestive enzymes (amylase, AMS; trypsin, CHY; lipase, LPS) in the intestine were also significantly declined. However, after the exogenous addition of AKG, both antioxidant and digestive enzyme activities were notably restored, and MDA content significantly decreased. As shown in PCoA, there were some differences in clustering degree between carbonate-alkaline exposure groups (groups T and F), AKG supplementation groups (groups F and FA) and control group (C). Compared with the group C, the abundance of Proteobacteria increased significantly in the groups T and F, while the abundance of Firmicutes decreased. The dominant genera in the groups T and F were *Sphingomonas* and *Shewanellaceae*, respectively. In contrast, in the AKG-supplemented groups (groups TA and FA), the abundance of Proteobacteria decreased substantially, and Firmicutes considerably increased. The dominant genus in the group TA shifted to *Bacillus*, while *Shewanellaceae* remained dominant in the group FA. According to KEGG function prediction, the functions of the intestinal microbiota were mainly involved in multiple physiological processes such as energy metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, nucleotide metabolism, signal transduction, lipid metabolism, replication and repair, immune system and immune disease. In summary, this study demonstrated that carbonate-alkaline exposure destroyed the antioxidant defense system in the intestine of crucian carp, leading to oxidative stress, while reducing the abundance of beneficial intestinal microbiota. AKG can enhance the antioxidant enzymes of crucian carp by neutralizing excess oxygen radicals and inhibiting lipid peroxidation. Owing to the improvement of the absorption and transport of nutrients, the digestive enzyme activity of crucian carp was intensified. Furthermore, AKG regulates the composition of beneficial intestinal flora by means of providing energy support. In conclusion, supplementing with AKG effectively alleviates the toxic effects of carbonate-alkaline environment.

Key words: α -ketoglutarate; carbonate alkaline stress; *Carassius auratus*; antioxidant enzymes; digestive enzymes; intestinal microbiota

Corresponding author: SUN Yanchun. E-mail: sunyc2004@163.com