

氨氮胁迫对中华绒螯蟹机体免疫抗菌、抗氧化能力、消化功能和肠道菌群的 影响及饲料补充褪黑素的保护作用

石敦雅 杨筱珍 宋亚猛 于晓雯 成永旭

2021年11月12日

1 摘要

为探究解决氨氮污染对中华绒螯蟹的不利影响，评估了氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫抗菌、抗氧化能力、消化酶和肠道微生物的影响以及补充褪黑素是否存在保护作用。结果表明，氨氮胁迫显著降低了螃蟹的免疫抗菌能力，MT显著提高了氨氮下螃蟹的抗菌能力 ($P < 0.05$)。氨氮显著破坏螃蟹的抗氧化防御 (T-AOC、T-SOD、GSH-Px, MDA) ($P < 0.05$)，但是MT饲料显著改善了这种不利影响。相似地，褪黑素饲料显著改善了氨氮引起的蛋白酶活性降低 ($P < 0.05$)。



池塘氨氮异常导致蟹死亡

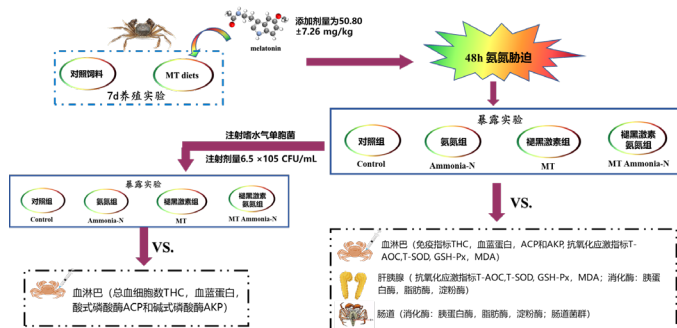
Dysgonomonas 和 *Rubellimicrobium* 在氨氮组螃蟹肠道中富集降低，而柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*) 则显著增加。总之，褪黑素对氨氮胁迫下的中华绒螯蟹生理功能具有保护作用，而氨氮胁迫导致了肠道益生菌减少，致病菌增多，可能与消化功能和免疫功能受损密切相关。

To explore the adverse effects of ammonia nitrogen pollution on *Eriocheir sinensis*, this study evaluated the effects of ammonia nitrogen stress on immune antibacterial, antioxidant capacity, digestive enzymes and intestinal microorganisms of *Eriocheir sinensis*, and whether melatonin supplementation had protective effects. The results showed that ammonia nitrogen stress significantly reduced the immune and antibacterial ability of crabs, and MT significantly improved the antibacterial ability of crabs under ammonia nitrogen ($P < 0.05$). Ammonia nitrogen significantly destroyed the antioxidant defense (T-AOC, T-SOD, GSH-Px, MDA) of crabs ($P < 0.05$), but MT feed significantly improved this adverse effect. Similarly, melatonin diet significantly improved the decrease of protease activity caused by ammonia nitrogen ($P < 0.05$). The enrichment of *dysgonomonas* and *Rubellimicrobium* in crab intestine in ammonia nitrogen group decreased, while *Citrobacter* increased significantly. In conclusion, melatonin has a protective effect on the physiological function of *Eriocheir sinensis* under ammonia nitrogen stress, and ammonia nitrogen stress leads to the decrease of intestinal probiotics and the increase of pathogenic bacteria, which may be closely related to the impairment of digestive function and immune function.

关键词：中华绒螯蟹，氨氮，褪黑素，免疫参数，抗氧化防御，肠道菌群

Key words: *Eriocheir sinensis*, Ammonia nitrogen, Melatonin, Immune parameters, Antioxidant capacity, Intestinal microflora

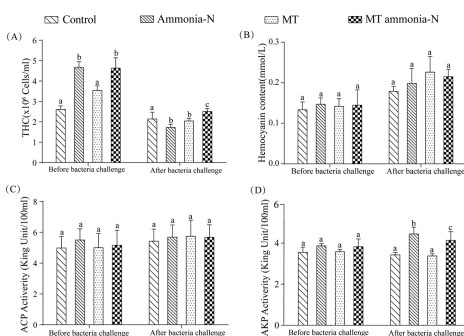
2 材料方法



选取处于蜕壳间期的蟹 (23.45 ± 4.87 g) 用于实验，所有实验蟹分为两组，分别饲喂对照饲料和褪黑素饲料7天，然后进行48h氨氮胁迫实验。胁迫实验结束一部分蟹收集血淋巴、肝胰腺、肠道及内容物进行分析，另一部分进行48h嗜水气单胞菌注射实验，之后收集血淋巴测定免疫抗菌指标。

3 结果与讨论

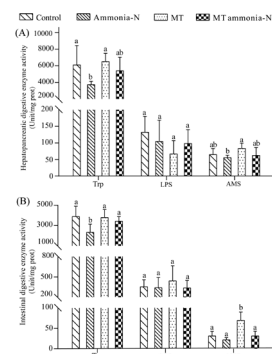
3.1 免疫参数



- 攻菌前，与对照组相比，氨氮组和MT氨氮组螃蟹的THC显著升高，MT组无显著差异，MT氨氮组与氨氮组THC无显著差异。
- 攻菌后，氨氮组和MT组螃蟹THC显著低于对照组，MT氨氮组显著高于对照组和氨氮组
- 攻菌前AKP活性各组无显著差异攻菌后，氨氮组AKP活性显著高于对照组，MT组和MT氨氮组，MT组和对照组无显著差异。

小结：氨氮胁迫导致螃蟹血细胞数下降对嗜水气单胞菌侵入的抵抗能力下降

3.2 消化酶活性

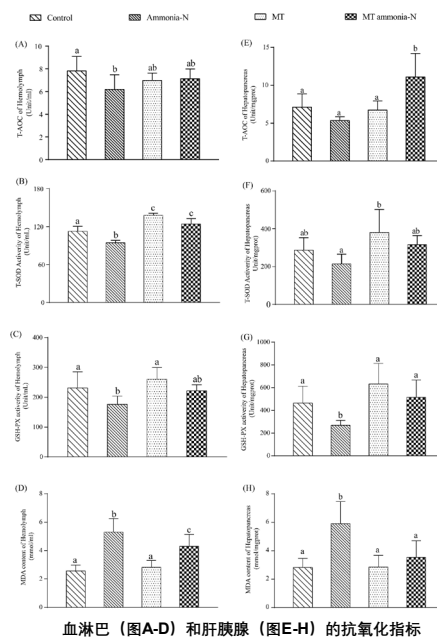


肝胰腺和肠道消化酶的活性 Trp: 胰蛋白酶; LPS: 脂肪酶; AMS: 淀粉酶

- 与对照组相比，氨氮组中华绒螯蟹肠道和肝胰腺的胰蛋白酶活性显著降低。
- MT氨氮组和氨氮组之间的肝胰腺胰蛋白酶活性没有显著差异，但肠胰蛋白酶活性显著高于氨氮组。
- MT组的肠道AMS活性显著高于对照组。

小结：氨氮显著降低了肝胰腺和肠道胰蛋白酶的活性，使用MT可能提高肠道淀粉酶活性，同时缓解氨氮胁迫对肠道胰蛋白酶活性的抑制。

3.3 免疫参数

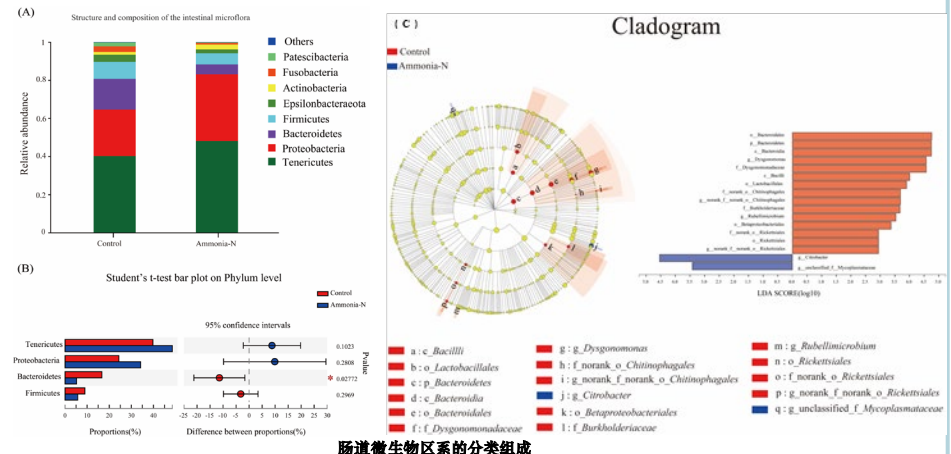


注：T-AOC: 总抗氧化能力; T-SOD: 超氧化物歧化酶; GSH-Px: 谷胱甘肽过氧化物酶; MDA: 丙二醛。

- 与对照组相比，氨氮胁迫显著降低了血淋巴T-AOC、T-SOD和GSH-Px指数
- MT组和MT氨氮组血淋巴T-SOD活性显著高于对照组，MT氨氮组显著高于氨氮组。
- 氨氮组和MT氨氮组血淋巴MDA含量显著高于对照组，但MT氨氮组显著低于氨氮组
- 对照组，氨氮组，MT组三组间肝胰腺T-AOC无显著差异，但是MT氨氮组显著高于三组
- 与对照组相比，氨氮胁迫显著降低肝胰腺GSH-Px的活性，MT和MT氨氮组与对照组无显著差异
- 肝胰腺的MDA含量，对照组，氨氮组和MT氨氮组三组间无显著差异，但是氨氮组显著高于三组。

小结：氨氮胁迫导致螃蟹抗氧化指标下降，引起氧化损伤产物含量升高，褪黑素可以提高抗氧化防御指标，减少氧化损伤产物的积累

3.4 肠道微生物



- 两组的优势菌为柔嫩菌、变形菌、拟杆菌、厚壁菌。对照组中柔嫩菌、变形菌、拟杆菌、厚壁菌的相对丰度为40.0%，24.0%，16.0%和8%。氨氮组的丰度分别为48%、35%、5.2%和8% (图A)。与对照组相比，氨氮组的拟杆菌丰度显著降低 (图B)。
- LEfSe分析显示氨氮胁迫可能降低了益生菌 *Dysgonomonas*, *Rubellimobium* 丰度，增加了致病菌柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*) 的感染风险。

小结：氨氮胁迫可能没有改变螃蟹的肠道微生物的优势菌，但是可能改变了优势细菌类群的相对丰度。拟杆菌门丰度在氨氮胁迫下显著下降。

4 结论

- 氨氮胁迫可能会降低中华绒螯蟹的免疫参数和抗氧化功能，导致其抗菌性能下降。而日粮中添加褪黑素在氨氮胁迫下，可以提高中华绒螯蟹的免疫参数抗氧化能力，从而提高其抗菌性能。
- 氨氮胁迫显著降低了螃蟹肠道胰蛋白酶活性影响消化功能，从而可能导致螃蟹在氨氮胁迫下能量供应不足，褪黑素在对螃蟹的消化功能保护方面作用不明显
- 氨氮胁迫可能会改变中华绒螯蟹的肠道微生物相对丰度，增加致病菌柠檬酸杆菌的丰度；其肠道微生物区系丰度的变化可能与免疫和消化功能变化有关，但其机制尚不清楚。

5 展望

我们发现氨氮胁迫降低了肠道中与消化相关的拟杆菌门益生菌的群落组成，同时消化酶的结果显示氨氮胁迫降低了消化酶的活性，筛选培育这些益生菌，验证其对消化功能的影响是下一阶段增强氨氮胁迫下河蟹消化功能的思路。同时还需验证柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*) 对肠道免疫功能的影响，研究其具体机制，为氨氮胁迫下河蟹的疾病防控提供理论依据。

致谢

衷心感谢杨筱珍教授对我科研工作、学习生活和论文写作的指导，同时也感谢成永旭教授为我提供了开展实验工作的条件。感谢课题组所有师兄师姐在实验技术和思路上的帮助，感谢师弟师妹在实验开展过程中的支持。最后感谢本研究完成过程中所参考文献的作者为我完成研究内容提供的资料参考。