

doi: 10.7541/2022.2020.199

饥饿胁迫对克氏原螯虾生理生化 and 肠道健康的影响

赖婷¹ 聂子盈¹ 张小雨¹ 孙存鑫² 徐骁迪¹ 蒋青³
刘明阳¹ 刘波^{1,2} 王爱民⁴

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081; 3. 西南科技大学生命科学与工程学院, 绵阳 621010;
4. 盐城工学院海洋与生物工程学院, 盐城 224051)

摘要: 研究旨在探究饥饿胁迫对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)血淋巴生理生化指标、肠道组织病理和肠道微生物的影响。对克氏原螯虾进行为期28d的饥饿胁迫, 分别于饥饿0、7d、14d和28d采集血淋巴和肠道样品。血淋巴生化分析结果表明, 谷丙转氨酶(ALT)没有发生显著变化, 血糖(GLU)水平随着饥饿时间延长逐渐降低($P<0.05$), 尿素(UREA)、甘油三酯(TG)水平呈现先上升后下降趋势($P<0.05$), 而总蛋白(TP)和谷草转氨酶(AST)则出现先下降后上升的趋势($P<0.05$)。采用HE染色和TUNEL检测技术对肠道组织切片观察发现, 饥饿胁迫使得克氏原螯虾肠道形态发生显著改变, 肠腔变宽, 肠绒毛萎缩, 肌肉层厚度变薄, 组织细胞凋亡指数上升。对肠道微生物16S rRNA V3—V4区进行高通量测序, Alpha多样性分析表明饥饿第7天肠道微生物多样性高于第0、第14和第28天。在门水平上12个样品主要以变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)等厌氧微生物为主, 但在饥饿胁迫的第7天, 厌氧微生物(Bacteroidetes、Firmicutes和Proteobacteria)在门水平丰度显著减少; 属水平上则主要以拟杆菌属(*Bacteroides*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、链球菌属(*Streptococcus*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)及嗜血杆菌属(*Haemophilus*)为主, 其属水平丰富度随饥饿程度的加深出现动态变化, 在第7天出现最小值。综合研究发现, 克氏原螯虾在面临食物短缺问题时, 可能会通过改变能量物质利用途径适应饥饿代谢过程, 同时不同程度饥饿胁迫会产生强烈的肠道应激反应, 其菌群组成结构在不同水平的物种丰度上均发生显著变化。长期饥饿会导致肠道绒毛萎缩, 细胞凋亡指数增加, 可能影响虾的健康。

关键词: 克氏原螯虾; 饥饿胁迫; 肠道健康; 血液生理; 16S rRNA

中图分类号: S968.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)01-0088-10



克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)又称淡水小龙虾, 属节肢动物门, 甲壳纲, 十足目, 螯虾科, 为美国中南部和墨西哥北部的土著物种, 经由日本传入我国, 是一种淡水经济甲壳动物^[1,2]。近年来, 以克氏原螯虾为主导的产业, 经济效益好, 产业链长, 已经成为江淮地区的特色产业^[3]。随着克氏原螯虾这一消费热点的持续增长, 克氏原螯虾养殖的相关研究变得尤为重要。目前我国的克氏原螯虾养殖主要以池塘精养和稻田综合种养等模式为主, 在养殖

过程中存在苗种退化, 养殖密度难以估算, 存在越冬饥饿、投喂不及时、不充分的现象。因此饥饿已经成为克氏原螯虾养殖过程中最易受到的生理胁迫之一^[4]。

在过去的几十年里, 科研人员针对饥饿对鱼类生理、内分泌和消化系统影响展开了大量的分析^[5], 许多结果表明年龄、基因型、饮食结构及栖息环境可以改变鱼体肠道微生物结构组成, 进而对机体的生长发育和免疫调控等产生影响^[6,7]。刘波等^[8]

收稿日期: 2020-09-07; 修订日期: 2021-04-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-48); 江苏省农业科技自主创新项目(CX(17)2007-01); 江苏省现代农业产业技术体系项目(JFRS-03); 南京农业大学大学生创新训练计划项目(1915A22)资助 [Supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund [CX(17) 2007-01]; Earmarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JFRS-03); Nanjing Agricultural University Innovation Training Program for College Students (1915A22)]

作者简介: 赖婷(1999—), 女, 本科; 研究方向为水产养殖学。E-mail: 18094210386@163.com

通信作者: 刘波(1978—), 博士, 研究员; 主要从事动物营养研究。E-mail: liub@ffrc.cn

发现长期饥饿会降低吉富罗非鱼GIFT(*Oreochromis niloticus*)机体免疫和抗氧化能力,影响罗非鱼的健康;Sun等^[9]在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的饥饿实验中发现饥饿会损害鱼体的肠道结构并改变其微生物群落组成,从而影响肠道消化并造成炎症;Semova等^[10]也发现斑马鱼(*Danio rerio*)在饥饿胁迫下,肠道微生物多样性呈现下降趋势,并且其微生物群落组成变化可能会影响脂肪的分解代谢和自噬水平。在饥饿对甲壳类生理的影响方面,王晨赫等^[11]发现河蟹(*Eriocheir sinensis*)在饥饿初期肠道微生物多样性会出现短暂上升,而后期则呈现下降趋势,其体内存在大量长期稳定存在的“优势种群”,在维持肠道内稳态方面发挥着重要作用。目前有关饥饿对克氏原螯虾生理功能影响的研究还比较匮乏,饥饿胁迫对克氏原螯虾生长及肠道健康方面的影响还有待进一步研究。因此本研究旨在通过组织病理学、高通量测序和生物信息学分析技术,探明不同程度饥饿胁迫对克氏原螯虾生理生化和肠道健康的影响,为克氏原螯虾的养殖和投喂等提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验虾及日粮

克氏原螯虾来源于江苏南京浦口区林涛怀善家庭农场,将规格基本一致的克氏原螯虾(20.2 ± 0.15) g随机分到6个养殖箱,每个养殖箱10尾。投喂饲料为市售克氏原螯虾商品日粮。每日以体重的2%—4%投喂颗粒饲料2次(9:00和18:00),每次达饱食,1h后移除残饵,在水族箱中驯化养殖2周后进行饥饿实验。

1.2 饲养管理

克氏原螯虾水族箱驯化14d后进行饥饿实验,实验过程保持日夜连续充气增氧,监测水温,吸污以保证水质清洁。整个饲养过程水质如下:水温为(28.0 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, pH为6.0—8.0,氨氮低于0.05 mg/L,硫化氢低于0.05 mg/L,溶解氧保持在5 mg/L以上。

1.3 样品采集与分析

在饥饿0d、7d、14d和28d采样,每个时间点采集6尾虾血淋巴测定常规生理生化指标以评定克氏原螯虾的生理状态;3尾虾肠道于4%多聚甲醛固定液,进行肠道HE染色和TUNEL细胞凋亡检测;3尾虾肠道内容物进行16SrRNA测序。

血淋巴生化指标测定 使用1 mL无菌注射器从克氏原螯虾的头胸甲后缘刺入围心腔,抽取0.5 mL血淋巴,放入1.5 mL装有等量抗凝剂的离心管中。4 $^{\circ}\text{C}$ 静置4h,4000 r/min离心15min,取上清液用于生

理生化指标的测定。尿素(UREA)、血糖(GLU)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)和甘油三酯(TG)水平均采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司制造的BS-400全自动生化分析仪测定。

肠道HE染色 从多聚甲醛固定液中取出固定好的肠道,修剪好后放入包埋盒内用蒸馏水冲洗0.5h,染色方法参照Fischer等^[12]依次脱水、浸蜡、包埋和切片。HE染色过程为:(1)先用低浓度乙醇溶液处理,逐渐提高浓度至脱水完成,随后将切片放入二甲苯中脱蜡;(2)数次用浓度梯度依次降低的乙醇溶液逐级复水,处理后放入蒸馏水;(3)用苏木素溶液处理3—8min后水洗,水洗处理完用1%盐酸-乙醇溶液分色,分色后水洗;(4)0.6%氨水返蓝处理后使用酒精逐级脱水;(5)脱水后用伊红染液染色1—3min,用乙醇溶液处理后用二甲苯处理至透明;(6)以中性树胶使切片密封,显微镜观察拍照。

肠道TUNEL细胞凋亡 将多聚甲醛固定液中取出的石蜡切片用酒精固定2h后进行TUNEL检测,TUNEL检测方法参照袁永辉等^[13]的改进方法:(1)石蜡切片在脱蜡后,用0.1% Triton X-100和0.1%枸橼酸三钠混合液低温处理5min;(2)切片在滴入TUNEL反应混合液前用0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)处理20min;(3)3% H_2O_2 -甲醇液浸泡15min后加入山羊血清;(4)吸去多余血清,加入POD转换剂进行避光孵育;(5)苏木素复染细胞核;(6)中性树胶封片后在光学显微镜下观察凋亡细胞。

16S rRNA测序 将虾的肠道内容物挤压出并收集,提取DNA进行细菌16S rRNA测序分析,每个时间点取3个重复共12个肠道内容物样本,方法参照沙玉杰^[14]分析内容包括OTU聚类、OTU抽平、OTU Venn图分析、OTU PCA分析、物种分类和丰度分析、物种热图分析、样品复杂度分析(单个样品复杂度分析和样品间复杂度分析)、显著性差异分析、LDA EffectSize分析、系统进化树、NMDS分析及功能注释等。

1.4 数据统计与分析

在完成16S rRNA测序后,使用MOTHUR软件在0.97相似度下进行聚类划分分类单元(Operational taxonomic unit, OTU),应用Ribosomal Database Project测序数据进行微生物种类划分。通过sliva rRNA数据库(<http://www.arb-silva.de/>)数据库对OTU进行比对,血淋巴生化指标采用SPSS软件单因子方差分析(One-way ANOVA)进行处理,多重比较用Duncan's进行差异显著性检验,结果用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE, $n=6$)表示。

2 结果

2.1 饥饿对克氏原螯虾血淋巴生化指标的影响

由表 1 可知, 血糖(GLU)水平随着饥饿时间延长呈现降低趋势($P<0.05$); 而尿素(UREA)和甘油三酯(TG)呈现先显著上升后下降的趋势, 且都在第 7 天达到了最大值($P<0.05$); 谷丙转氨酶(ALT)没有发生显著变化; 总蛋白(TP)和谷草转氨酶(AST)呈先下降后上升的趋势, 其中总蛋白(TP)在饥饿 7d 时出现最小值($P<0.05$)。长期处于饥饿状态的克氏原螯虾血淋巴生理发生紊乱。

2.2 饥饿胁迫对克氏原螯虾肠道组织结构的影响

克氏原螯虾肠道 HE 染色结果显示(图 1), 对照组上皮细胞与黏膜下层一起向内形成肠绒毛, 绒毛排列相对整齐, 随着饥饿时间的延长 28d 时, 克氏原螯虾肠道上皮细胞萎缩, 肌肉层厚度减小, 肠绒毛高度呈现萎缩、凌乱的现象。

2.3 饥饿胁迫对克氏原螯虾肠道细胞凋亡的影响

克氏原螯虾肠道组织细胞凋亡结果, 肠道组织可见大量的 TUNEL 阳性细胞(图 2), 整个细胞着色较深, 细胞核内有较强的棕色颗粒。小龙虾肠道组织细胞凋亡平均指数结果表明(图 2), 与饥饿 0d 组

表 1 饥饿胁迫对克氏原螯虾血淋巴生化指标的影响

Tab. 1 Effects of starvation stress on hemolymph physiology indexes of *Procambarus clarkii* (n=6)

饥饿时间 Starvation (d)	尿素 UREA (mmol/L)	葡萄糖 GLU (mmol/L)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)	总蛋白 TP (g/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)
0	0.75±0.01 ^b	47.29±3.35 ^a	4.73±0.48	21.27±2.67 ^{ab}	66.96±5.76	9.03±0.40 ^b
7	1.19±0.06 ^a	28.38±3.51 ^b	4.86±1.16	17.83±0.73 ^{bc}	45.14±9.43	11.54±0.91 ^a
14	0.78±0.14 ^b	35.66±1.63 ^b	6.25±0.32	27.20±3.55 ^a	52.12±7.60	10.09±0.70 ^{ab}
28	0.67±0.07 ^b	19.42±1.46 ^c	5.10±0.62	11.57±1.54 ^c	63.41±5.10	9.06±0.26 ^b

注: 同一列数据中有不同字母表示差异显著($P<0.05$)
Note: Different letters in the same column of data indicate significant differences ($P<0.05$)

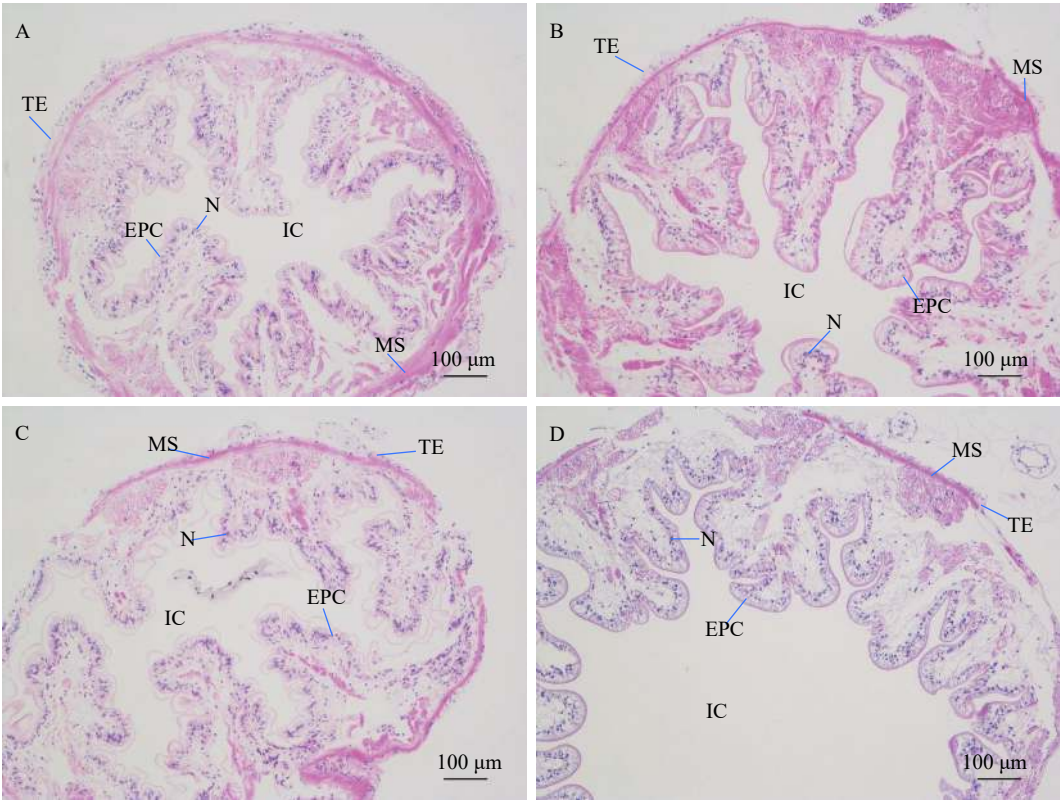


图 1 饥饿后克氏原螯虾的肠道组织学结构

Fig. 1 The intestinal histological structure of *Procambarus clarkii* after starvation (200×)

以上各图 A—D 分别为饥饿 0、7d、14d、28d; EPC. 上皮细胞; TE. 外膜; IC. 肠腔; MS. 肌肉层; N. 细胞核

The figures A—D are 0, 7d, 14d and 28d after starvation; EPC. epithelial cell; TE. outer membrane; IC. intestinal cavity, MS. muscle layer; N. nucleus

比较, 饥饿7d组无显著差异, 饥饿14d组和饥饿28d组有显著差异, 随饥饿时间的延长, 凋亡平均指数有上升趋势。

2.4 克氏原螯虾在不同饥饿程度下肠道微生物组成多样性差异分析

OUT venn图 OTU (Operational Taxonomic Units)的丰度初步说明了样品的物种丰富程度。由图3可以看出, 在0.97的相似度下, 得到了每个组的OTU个数, 利用Venn图可以展示多组别共有和各自特有OTU数目, 直观展示样品间OTU的重叠情况。4个不同饥饿程度12个样品中共产生2317种OTU, 其中4个不同饥饿程度共同含有671种OTU。D0、D7、D14和D28样品中独有的OTU数量分别为78、259、133和208, 差异较为明显。综上可分析出, D7的肠道微生物多样性最多, D28次之, D0最少。

不同分类水平中物种组成及其动态变化 使

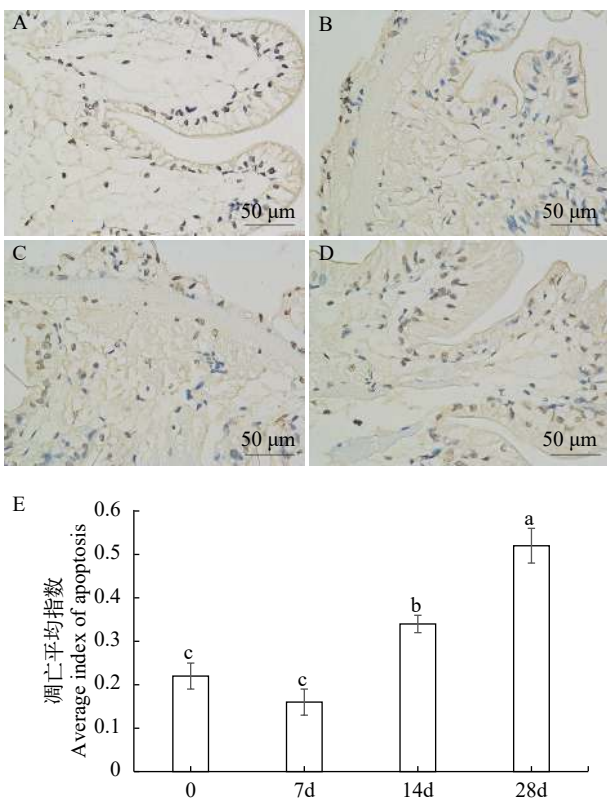


图2 饥饿后克氏原螯虾肠道组织TUNEL染色及凋亡平均指数柱状图

Fig. 2 TUNEL staining (400 ×) and average apoptotic index histogram of intestinal tissue of *Procambarus clarkii* after starvation ($n=6$)

以上各中图A—D分别为饥饿0、7d、14d、28d, 图E为凋亡平均指数柱状图; 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Figures A—D of the above are starvation 0, 7d, 14d and 28d, and figure E is a histogram of average apoptosis index; different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

用基于OTU的丰度及注释信息, 对每个样品在各分类水平(Phylum, Class, Order, Family)上的序列数目占总序列数的比例进行统计, 可以有效地评估样本的物种注释分辨率及样本的物种复杂度。在样品不同分类水平柱状图(图4)中, 鉴定出21个细菌门类, 相对丰度较高(丰度大于0.5%)且12个样品中均有分布的细菌门类有变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和柔膜菌门(Tenericutes)。随着饥饿程度的不断加深, 拟杆菌门(Bacteroidetes)的种群数量出现显著变化, 经历了先减少后增加的动态变化, 且在饥饿的第7天出现最小值, 第28天逐渐回到至第0天水平; 厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)的种群数量则在饥饿胁迫的第7天达到最大值, 此时复杂度最高, 而在饥饿胁迫28天后下降至接近第0天水平, 复杂度也随之降低。在纲水平上, 种群丰度变化最大的是拟杆菌纲(Bacteroidia), 其变化趋势与拟杆菌门(Bacteroidetes)保持高度一致, 而芽孢杆菌纲(Bacilli)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和放线菌纲(Actinobacteria)微生物水平则呈现先显著上升趋势, 并在后期维持相对高位的动态平衡。在目水平上, 肠杆菌目(Enterobacteriales)和乳杆菌目(Lactobacillales)变化较大, 其中隶属于肠杆菌目(Enterobacteriales)的肠杆菌科(Enterobacteriaceae)微生物种群数量在饥饿开始后急剧下降, 后虽有涨幅, 但仍低于初始水平。

不同门下属水平分析 如图5所示, 在不同程度饥饿胁迫下克氏原螯虾肠道内定植最多的是拟杆菌门(Bacteroidetes)下的拟杆菌属(*Bacteroides*), 其水平在饥饿胁迫后第7天降至最小值, 而后出现大幅攀升; 厚壁菌门(Firmicutes)下的链球菌属(*Streptococcus*)在饥饿胁迫开始后出现繁殖速度加快, 并在后期保持较高位种群数量的稳定; 变形菌门(Proteobacteria)下的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)

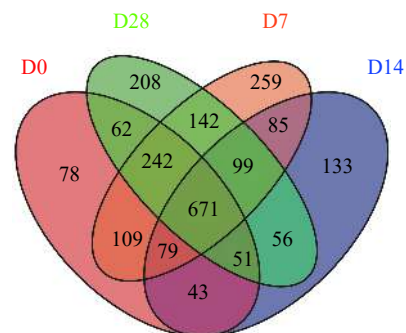


图3 OTU venn图

Fig. 3 OTU venn diagram

对饥饿变化最为敏感,胁迫开始后立即降至低水平,并在后期维持低位种群数量;同属变形菌门(*Proteobacteria*)的奈瑟菌属(*Neisseria*)及嗜血杆菌属(*Haemophilus*)在饥饿胁迫后的数量变化上具有一致性,出现小幅增殖,随后保持稳定。

PICRUSt2二级通路注释 为了了解不同饥饿程度小龙虾肠道菌群功能,采用PICRUSt2软件对肠道菌群功能进行了预测(图6)。饥饿的4个实验组,其肠道微生物参与的代谢基本相似,主要参与了新陈代谢(Metabolism)、环境信息加工(Environmental information processing)和遗传信息加工(Genetic information processing)这三大功能。这些微生物为宿主克氏原螯虾提供了包括糖代谢(Carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(Amino acid metabolism)、脂代谢(Lipid metabolism)、能量代谢(Energy metabolism)、膜运输(Membrane transport)、转录(Transcription)、翻译(Translation)、折叠、分类和降解(Folding, sorting and degradation)在内的等42个功能。

3 讨论

3.1 饥饿对小龙虾血淋巴生理的影响

在养殖过程中,饥饿是一种应激因子,不论是

长期饥饿还是短期饥饿,都会不同程度地干扰机体内分泌节律,进而影响能源物质的利用^[15]。本实验发现,克氏原螯虾在长达28d的饥饿胁迫中,GLU水平随着饥饿时间延长不断降低,说明糖类是维持机体生命活动的必要燃料,在生命代谢过程中具有重要意义,这与王春忠等^[16]在长毛对虾中的研究结果一致。此外,在判断机体营养状态时,一般以血淋巴总蛋白作为主要参考指标^[17],同时UREA作为其主要代谢产物与机体对能源物质的调控有着密切联系^[18]。本实验发现饥饿胁迫下的克氏原螯虾TP水平呈下降后上升的趋势,在饥饿7d时出现最小值,而蛋白质的代谢产物UREA的含量则呈现先上升后下降趋势,在饥饿7d时出现最大值,两者含量变化完全相对应。结果表明克氏原螯虾在面临饥饿胁迫时,可通过蛋白质分解代谢为机体生命活动提供能量,这与吴旭干等^[19]对三疣梭子蟹初孵幼体的整期饥饿研究结果一致。ALT与AST作为蛋白质和氨基酸代谢中的2种重要转氨酶,在衡量动物机体肝功能是否正常具有重要指示作用^[20]。当动物肝细胞受损时,其体内ALT与AST活性会迅速增强,并被释放到血液中,同时作为体内蛋白质和氨基酸代谢终产物的UREA减少,动物肝脏细胞受到

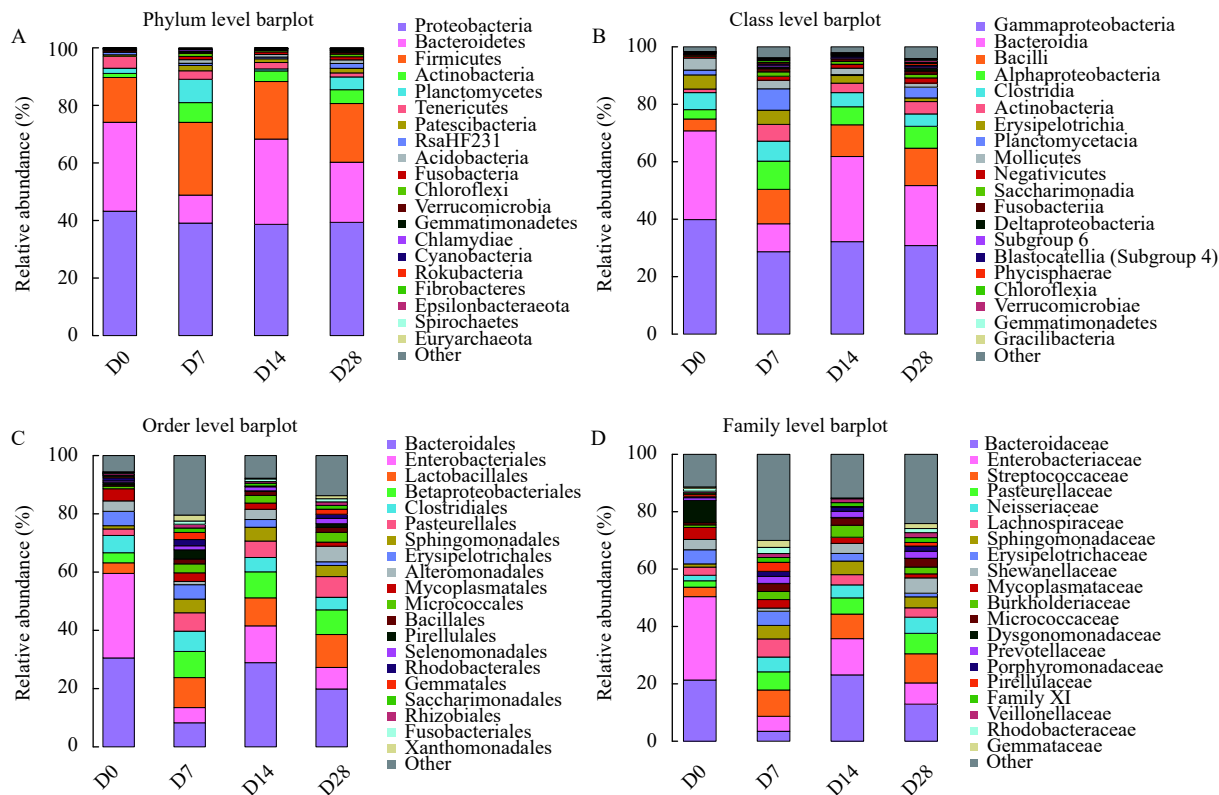


图4 样品不同分类水平中物种profiling柱状图

Fig. 4 Species profiling histogram in different classification levels of samples

以上各图A—B别为: 门、纲、目、科水平物种丰度柱状图

A—B. phylum, class, order and family level species abundance histogram

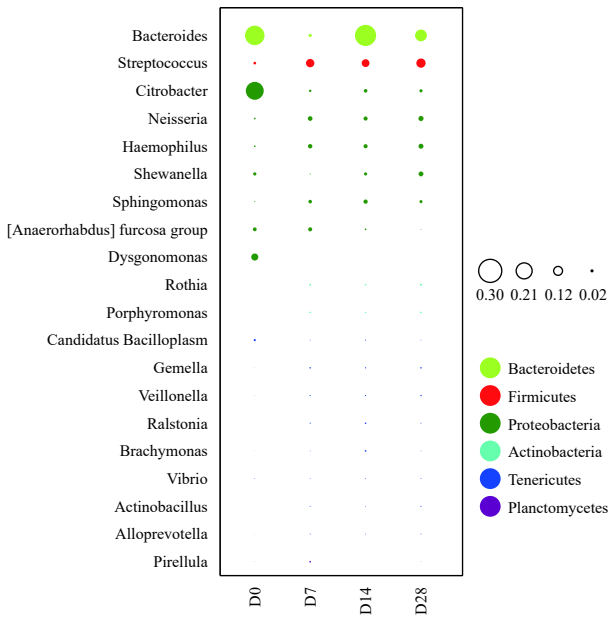


图5 不同门下top20属水平的气泡图

Fig. 5 Bubble diagrams of top20 genus levels under different phyla

损害的程度上升^[21, 22]。在本实验中,随着饥饿时间的延长,克氏原螯虾血淋巴中AST活性变化出现显著差异,在饥饿第14天出现最大值;ALT含量变化

虽未见显著差异,但与AST的变化趋势具有相似性。这说明饥饿则会导致克氏原螯虾机体肝细胞一定程度受损,蛋白质和氨基酸代谢出现紊乱,最终影响机体生长。TG作为机体储存能量的载体,长期饥饿会导致其水平显著下降^[23],本实验随着饥饿程度的不断加深,克氏原螯虾TG水平呈现先显著上升后下降的趋势,且在第7天达到最大值。联系本实验克氏原螯虾生化组成数据,发现克氏原螯虾在面临饥饿胁迫时,会通过糖异生作用,加快蛋白质的分解代谢,合成大量脂类储能物质以应对长期的饥饿胁迫,这一点与朱艺峰等^[24]对花鲈的周期性饥饿研究结果具有相似性。

3.2 饥饿胁迫对克氏原螯虾肠道组织的影响

肠道是机体重要的消化器官,各种营养物质通过上皮细胞吸收进入血液,进而供给全身的营养需求^[25],肠腔大小,肠道黏膜上的褶皱高度,肌层厚度,上皮组织细胞的数量都与机体的营养物质的消化吸收能力密切相关^[26]。同时肠道组织还通过肠腔上细胞膜和肠上皮细胞间的紧密连接,介导着机体的非特异性免疫防御功能^[27]。本实验中随着饥饿时间的延长,克氏原螯虾肠绒毛萎缩、凌乱,上皮细胞凋亡指数上升,说明饥饿胁迫不仅能够有效诱

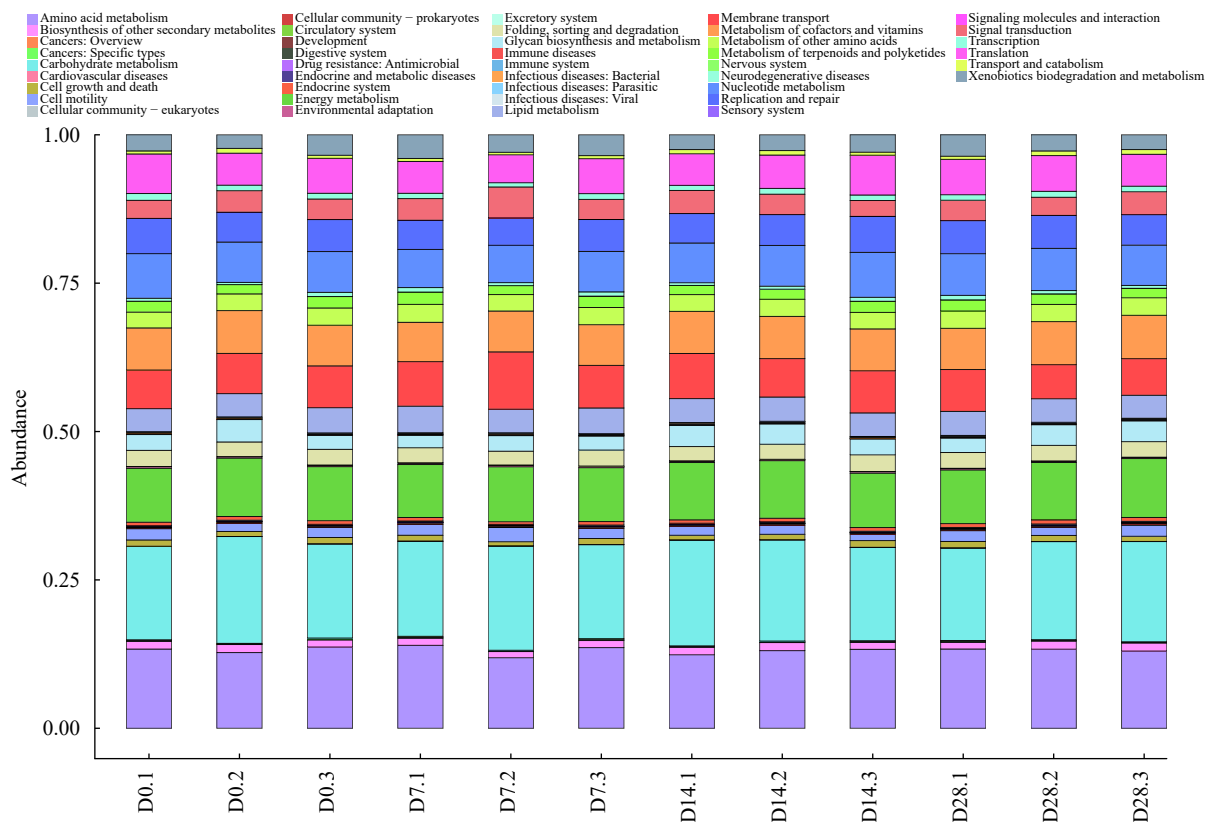


图6 PICRUSt2二级通路注释结果

Fig. 6 PICRUSt2 secondary path annotation results

导肠道发生显著的形态变化以适应食物短缺的问题,同时细胞凋亡作为动物进化过程中保留下来的高度保守机制,也造成肠道产生炎症反应,肠道的屏障进一步受损。另外,在该实验进行过程中,28d的饥饿并没有导致大量的克氏原螯虾死亡,表明克氏原螯虾在面临饥饿胁迫时,可通过下调消化系统结构和功能来节约能量以满足其基本能量需求^[28]。

3.3 饥饿对克氏原螯虾肠道微生物的影响

新生动物在没有摄取食物之前,肠道内没有任何微生物,当其开口摄食后,肠道绒毛上皮便成为微生物的集聚地,分泌各种酶类与宿主相互依存、互惠共生^[29]。与鱼类等脊椎动物一样,克氏原螯虾肠道微生物菌群在影响机体生长代谢、健康免疫等方面具有重要作用^[30],肠道菌群生态的失衡,会导致虾体内环境出现紊乱,从而诱发疾病^[31]。

本实验基于16S rRNA的高通量测序技术在门水平发现克氏原螯虾肠道是一个由好氧菌和厌氧菌组成的动态菌群。在饱食情况下变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)等厌氧占绝对优势(90%以上),这与李可等^[32]对南美白对虾肠道微生物群落分析结果相似。在不同程度的饥饿胁迫下,其微生物结构组成出现显著差异。其中差异最显著的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)在饥饿开始后便骤降至较低水平;厚壁菌门Firmicutes中的链球菌属(*Streptococcus*),其丰度随着饥饿时间的延长不断增加;拟杆菌门(Bacteroidetes)中的拟杆菌属(*Bacteroides*),在饥饿胁迫的初期即第7天出现最小值,后期虽有上升趋势,但增幅较小,与初始水平仍有较大差距。在菌群功能上,黄锦等^[33]发现柠檬酸杆菌作为一种条件致病菌大量出现在施用化肥的养殖田块中,该菌种极易爆发大规模杆菌疾病,而在本实验中柠檬酸杆菌骤降至较低水平,可能是触发了某些肠道保护机制^[34],使得致病菌数量显著减少。另外Zhang等^[35]发现拟杆菌门(Bacteroidetes)及厚壁菌门(Firmicutes)是动物胃肠道参与食物残余物代谢的主要细菌,在本研究当中,厚壁菌门(Firmicutes)种群数量出现了一定程度的上升,Mountfort等^[36]曾指出厚壁菌门(Firmicutes)可以产生多糖水解酶进而促进胃肠道内容物的分解代谢进程,其分解产生的小分子糖类及脂肪酸是供给肠道组织细胞能量代谢的重要来源^[37],其种群数量在饥饿胁迫开始后的迅速增长并持续稳定说明厚壁菌门(Firmicutes)在饥饿胁迫下克氏原螯虾的能量代谢方面发挥了重要作用。

此外,肠道微生物在漫长的进化过程中与宿主形成了互惠共生关系,其作为一个环境因素参与宿

主众多营养代谢和免疫调控进程^[38]。肠道菌群的代谢产物作为一种信号分子能作用于机体,对机体进行宏观调控,同样的机体营养状态的改变也能反作用于肠道菌群,从而对菌群参与的代谢途径产生影响^[39, 40]。因此我们进一步对不同程度饥饿胁迫下的克氏原螯虾肠道微生物群落进行功能预测分析,KEGG富集结果显示不同程度饥饿胁迫下肠道微生物参与的代谢类型并没有明显规律可循,但是注释水平较高的糖代谢和脂代谢及氨基酸代谢等通路仍是值得关注的內容。科研人员在对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)幼鱼^[41]的饥饿研究中发现短期饥饿会通过提升脂代谢途径来供能,氨基酸代谢途径的增强则出现在长期胁迫后;太平洋鲑(*Oncorhynchus* spp.)^[42]在饥饿初期首先利用肝脏糖原和部分肠系膜脂肪供能,后期则主要利用肠系膜脂肪和少量蛋白质。有研究指出,饥饿可以引起肠道微生物的种群数量的巨大改变以适应自身能量需求^[43],通过比对各项指标,我们发现出现上述差异的原因可能是克氏原螯虾机体面对饥饿做出的应激反应^[44],通过改变肠道菌群组成结构,缓解机体的生物紊乱,提高抗氧化应激能力,减少体内炎症,有效改善肠道内的微生态。

总之,克氏原螯虾在面临食物短缺问题时,可能会通过改变能量物质利用途径适应饥饿代谢过程,同时不同程度饥饿胁迫会产生强烈的肠道应激反应,其菌群组成结构在不同水平的物种丰度上均发生显著变化。长期饥饿会导致肠道绒毛萎缩,细胞凋亡指数增加,影响虾的健康。目前,国际上越来越多的研究者发现,适度的饥饿对提高养殖动物抗氧化应激和免疫水平有显著影响,这种改善机体健康的效应已经得到了广泛关注。本研究借助高通量测序技术和生物信息学统计来寻找不同程度饥饿胁迫对克氏原螯虾血淋巴生理生化及肠道微生物的影响,有一定的代表性,为克氏原螯虾的健康养殖提供了理论参考,同时也为进一步探明克氏原螯虾肠道微生物动态平衡机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Tang X S. *Procambarus clarkii* [J]. *Bulletin of Biology*, 2001, **35**(9): 19-20. [唐鑫生. 克氏原螯虾 [J]. *生物学通报*, 2001, **35**(9): 19-20.]
- [2] Xiao F, Liu Z S, Guo Y F, et al. Development report of crayfish industry in China (2017) [J]. *China Fisheries*, 2017, **500**(7): 16-25. [肖放, 刘忠松, 郭云峰, 等. 中国小龙虾产业发展报告(2017) [J]. *中国水产*, 2017, **500**(7): 16-25.]
- [3] Zhang S L. Crayfish industry, agriculture and economic

- growth factors cause analysis and impact [J]. *Ecological Economics* (Academic edition), 2010(2): 208-211. [张胜来. 小龙虾产业引发农业经济增长的因素分析及影响 [J]. 生态经济(学术版), 2010(2): 208-211.]
- [4] Yin Y. Characteristics and methods of diverse culture models of *Procambarus clarkii* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010: 4-6. [殷悦. 克氏原螯虾不同养殖模式的特点和养殖方法 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 4-6.]
- [5] Bar N, Volkoff H. Adaptation of the Physiological, Endocrine, and Digestive System Functions to Prolonged Food Deprivation in Fish [M]. Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation. Berlin: Springer, 2012: 69-89.
- [6] Minoru K, Takashi S. Effects of rearing temperature and dietary saccharides on the production of gases and organic acids by gut microbes of and omnivorous teleost carp *Cyprinus carpio*, in micro-scale batch cultures [J]. *Japanese Society for Aquaculture Science*, 2010, **49**(3): 329-338.
- [7] Xia J, Lin G, Fu G, *et al.* The intestinal microbiome of fish under starvation [J]. *BioMed Central Genomics*, 2014(15): 266.
- [8] Liu B, He Q G, Tang Y K, *et al.* Effects of starvation on growth, physiological and biochemical parameter of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, **16**(2): 230-237. [刘波, 何庆国, 唐永凯, 等. 饥饿胁迫对吉富罗非鱼生长及生理生化指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2009, **16**(2): 230-237.]
- [9] Sun S M, Su Y L, Yu H, *et al.* Starvation affects the intestinal microbiota structure and the expression of inflammatory-related genes of the juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Aquaculture*, 2020(517): 734764.
- [10] Semova I, Juliana D, Stombaugh J, *et al.* Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, **12**(3): 277-288.
- [11] Wang C H, Zhou Y F, Fang D A, *et al.* Effects of starvation and refeeding on intestinal microflora of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(4): 748-756. [王晨赫, 周彦锋, 方弟安, 等. 饥饿与重摄食对河蟹肠道菌群结构的影响 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(4): 748-756.]
- [12] Fischer A H, Jacobson K A, Rose J, *et al.* Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(6): 4986.
- [13] Yuan Y H, Wu R L, Wang X, *et al.* Improved method for TUNEL technique and its applications [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2004, **33**(7): 579-581. [袁永辉, 吴人亮, 王曦, 等. 原位细胞凋亡TUNEL法的改进及其应用 [J]. 陕西医学杂志, 2004, **33**(7): 579-581.]
- [14] Sha Y J. Studies on probiotic mechanism of lactic acid bacteria in *Litopenaeus vannamei* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 41-42. [沙玉杰. 乳酸菌对凡纳滨对虾益生机理的研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2016: 41-42.]
- [15] Schwarting H, Koop H, Gellert G, *et al.* Effect of starvation on endocrine cells in the rat stomach [J]. *Regulatory Peptides*, 1986, **14**(1): 33-39.
- [16] Wang C Z, Lin G R, Yan T, *et al.* Microbial community in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestine and its culture environment [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(5): 706-712. [王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及虾肠道微生物群落结构研究 [J]. 水产学报, 2014, **38**(5): 706-712.]
- [17] Blijenberg B G, Leijnse B. Application of Reference methodology: determination of total protein in serum [J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2009, **21**(10): 601-604.
- [18] Kaushik S J, Seiliez I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **41**(3): 322-332.
- [19] Wu X G, Fu R B, Cheng Y X, *et al.* Effects of starvation on the survival and the mainly biochemical composition of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) freshly hatched larvae (Z_1) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2006, **41**(6): 7-13. [吴旭干, 傅荣兵, 成永旭, 等. 饥饿对三疣梭子蟹初孵幼体(Z_1)存活及主要生化成分的影响 [J]. 动物学杂志, 2006, **41**(6): 7-13.]
- [20] Huang K, Liang X F, He S, *et al.* Effect of isoleucine on mTOR signaling pathway and nitrogen metabolism of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(5): 879-886. [黄康, 梁旭方, 何珊, 等. 异亮氨酸对鳊mTOR信号通路及氮代谢影响 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(5): 879-886.]
- [21] Wu L F, Zhou K, Yan L, *et al.* Effects of fermented soybean meal replacement of fishmeal on main biochemical parameters, protease activity and protein metabolism of *Rhynchocypris lagowskii* Dybowski [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, **42**(1): 90-95. [吴莉芳, 周锴, 闫磊, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对洛氏鲮血清主要生化指标、蛋白酶活力及蛋白质代谢的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, **42**(1): 90-95.]
- [22] Dai W F, Zhang J J, Qiu Q F, *et al.* Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018(80): 191-199.
- [23] Sun H M. Effects of starvation on the blood indices and immunity function of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco* Richardson) [D]. Changchun: Jilin Agriculture University, 2004: 19-28. [孙红梅. 饥饿对黄颡鱼血液指标及免疫机能的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2004: 19-28.]
- [24] Zhu Y F, Lin X, Wu W X, *et al.* Morphological changes

- of *Lateolabrax japonicus* during periodical starvation and its relatively discriminant analysis for starved status [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, **13**(1): 45-51. [朱艺峰, 林霞, 吴望星, 等. 周期性饥饿下花鲈的形态变化与饥饿状态的相对判别分析 [J]. *中国水产科学*, 2006, **13**(1): 45-51.]
- [25] Russell R I, Lee F D. Tests of small-intestinal function-digestion, absorption, secretion [J]. *Clinics in Gastroenterology*, 1978, **7**(2): 277-315.
- [26] Keelan M, Walker K, Thomson A B R. Intestinal morphology, marker enzymes and lipid content of brush border membranes from rabbit jejunum and ileum: effect of aging [J]. *Mechanisms of Ageing & Development*, 1985, **31**(1): 49-68.
- [27] Zhou Q C, Buentello J A, Gatlin III D M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) [J]. *Aquaculture*, 2010, **309**(1): 253-257.
- [28] Chen Y H, Cheng A G, Zhang X P. Protecting action of glutamine on intestinal mucosal damage in complete starved rats [J]. *Clinical Focus*, 2011, **26**(19): 1684-1686, 1652. [陈玉宏, 程爱国, 张小平. 谷氨酰胺对饥饿大鼠肠道黏膜损伤的保护作用 [J]. *临床荟萃*, 2011, **26**(19): 1684-1686, 1652.]
- [29] Bian G R. The impacts of breed and nursing sow on the growth and the spatial-temporal pattern succession of gut microbiota in newborn piglets [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014: 9-11. [边高瑞. 品种和哺乳母猪对新生仔猪生长发育及肠道菌群时空演变的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 9-11.]
- [30] Ohno H. Gut Commensal Microbes and the Gut Immune System [M]. Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications. Berlin: Springer, 2015: 149-166.
- [31] Zhang L Q, Li Y, Deng P, *et al.* Characterizing the composition and biodiversity of intestinal microbiota between healthy and sick *Procambarus clarkii* [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2020, **47**(1): 37-40. [张立强, 李媛, 邓平, 等. 健康和患病克氏原螯虾肠道微生物群落结构和多样性分析 [J]. *水产科技情报*, 2020, **47**(1): 37-40.]
- [32] Li K, Zheng T L, Tian Y, *et al.* Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Acta Microbiological Sinica*, 2007, **47**(4): 649-653. [李可, 郑天凌, 田蕴, 等. 南美白对虾肠道微生物群落的分子分析 [J]. *微生物学报*, 2007, **47**(4): 649-653.]
- [33] Huang J, Cheng Y X, Wang H F, *et al.* A preliminary study on the water bacteria of rice-crayfish co-culture paddy field in different fertilization modes [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, **29**(4): 516-525. [黄锦, 成永旭, 王海锋, 等. 不同施肥模式下的稻-克氏原螯虾田块水体菌群初探 [J]. *上海海洋大学学报*, 2020, **29**(4): 516-525.]
- [34] Cheadle G A, Cotantini T W, Bansal V, *et al.* Cholinergic signaling in the gut: a novel mechanism of barrier protection through activation of enteric glia cells [J]. *Surgical Infections*, 2014, **15**(4): 387-393.
- [35] Zhang Y J, Li S, Gan R Y, *et al.* Impacts of gut bacteria on human health and diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(4): 7493-7519.
- [36] Mountfort D O, Campbell J, Clements K D. Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(3): 1374-1380.
- [37] Fergus S. Exploring the link between gut microbes and obesity [J]. *Future Microbiology*, 2007, **2**(3): 261-263.
- [38] Gerritsen J, Smidt H, Rijkers G T, *et al.* Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics [J]. *Genes & Nutrition*, 2011, **6**(3): 209-240.
- [39] Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, *et al.* Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review [J]. *European Journal of Nutrition*, 2015, **54**(3): 325-341.
- [40] Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease [J]. *European Journal of Pediatrics*, 2015, **174**(2): 151-167.
- [41] Su H, Ou Y J, Li J E, *et al.* Effects of starvation on anti-oxidative capacity, Na^+/K^+ -ATPase activity and biochemical composition in juvenile *Trachinotus ovatus* [J]. *South China Fisheries Science*, 2012, **8**(6): 28-36. [苏慧, 区又君, 李加儿, 等. 饥饿对卵形鲳鲹幼鱼不同组织抗氧化能力、 Na^+/K^+ -ATP酶活力和鱼体生化组成的影响 [J]. *南方水产科学*, 2012, **8**(6): 28-36.]
- [42] Luo B, Feng J, Jiang B G, *et al.* The effects of starvation on growth, proximate composition and biochemical index of plasma of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(3): 541-546. [罗波, 冯健, 蒋步国, 等. 饥饿对太平洋鲑生长、机体组成及血浆相关生化指标变化研究 [J]. *水生生物学报*, 2010, **34**(3): 541-546.]
- [43] Schirf V R, Turner P, Selby L, *et al.* Nutritional status and energy metabolism of crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) muscle and hepatopancreas [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology*, 1987, **88**(3): 383-386.
- [44] Zhang J H, Gui F, Si J, *et al.* Research progress on intestinal tract microorganisms in zebrafish [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2017, **25**(6): 54-59. [张金花, 桂芳, 司婧, 等. 斑马鱼肠道微生物的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, **25**(6): 54-59.]

EFFECTS OF STARVATION STRESS ON HEMOLYMPH PHYSIOLOGY AND INTESTINAL HEALTH OF *PROCAMBARUS CLARKII*

LAI Ting¹, NIE Zi-Ying¹, ZHANG Xiao-Yu¹, SUN Cun-Xin², XU Xiao-Di¹, JIANG Qing³,
LIU Ming-Yang¹, LIU Bo^{1,2} and WANG Ai-Min⁴

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, 214081 China; 2. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 4. School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China)

Abstract: *Procambarus clarkii* is originated from the south-central United States and northern Mexico. In the 1930s, it was introduced to China as a freshwater economic crustacean via Japan because of its good economic benefits and a characteristic industrial chain. As the consumption hotspot of *P. clarkii* to grow, fundamental researches on the cultivation of *P. clarkii* were incredibly important. At present, researchers carried out a large number of analysis on the effects of starvation on the physiology, endocrine, and digestive systems of crustacea. To explore the effects of starvation stress on hemolymph physiological biochemical indexes, intestinal histology and intestinal flora of *P. clarkii* through histopathology, high-throughput sequencing and bioinformatics analysis techniques, *P. clarkii* was subjected to a 28-day starvation. Hemolymph and intestinal tract were collected at 0, 7, 14 and 28 days of starvation, respectively. Hemolymph was collected to assess the physiological status of *P. clarkii* by measuring conventional physiological and biochemical indexes; the intestinal tract was collected in 4% paraformaldehyde fixative for intestinal HE staining and TUNEL cell apoptosis detection; and intestinal contents were taken for 16S rRNA sequencing. The results of hemolymph biochemical analysis showed that alanine aminotransferase (ALT) did not change significantly; glucose (GLU) levels gradually decreased with the prolongation starvation ($P<0.05$). The levels of urea (UREA) and triglyceride (TG) first increased and then decreased ($P<0.05$), total protein (TP) and aspartate aminotransferase (AST) first decreased and then increased ($P<0.05$). Starvation stress caused significant changes in the intestinal morphology of *P. clarkii*: the intestinal cavity became wider, the intestinal villi were atrophied, the thickness of the muscle layer became thinner, and the tissue cell apoptosis index increased. High-throughput sequencing was performed on the 16S rRNA V3-V4 region of intestinal microbes. The Alpha diversity analysis showed that the highest diversity of intestinal microbes was on the day 7 of starvation. At the phylum level, the 12 samples were mainly anaerobic microorganisms such as Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, etc. However, on the 7th day of starvation stress, the population abundance of anaerobic microorganisms (Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria) decreased significantly; at the genetic level, the abundance of *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Streptococcus*, *Neisseria* and *Haemophilus* increased significantly. The results indicated that *P. clarkii* may adapt to the process of starvation metabolism by changing the energy material utilization pathways and the intestinal microbiological composition structure.

Key words: *Procambarus clarkii*; Starvation stress; Intestinal health; Hemolymph physiology; 16S rRNA