

氨氮胁迫对大口黑鲈幼鱼组织结构、酶活及肠道微生物的影响

魏孟申 郑涛 路思琪 强俊 陶易凡 李岩 徐跑

AMMONIA-N STRESS ON TISSUE STRUCTURE, ENZYME ACTIVITY AND INTESTINAL MICROBIOTA OF *MACROPTERUS SALMOIDES*

WEI Meng-Shen, ZHENG Tao, LU Si-Qi, QIANG Jun, TAO Yi-Fan, LI Yan, XU Pao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0054>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

慢性氨氮胁迫对台湾泥鳅幼鱼生长、免疫及组织结构的影响

EFFECTS OF CHRONIC AMMONIA STRESS ON GROWTH, IMMUNITY AND HISTOLOGICAL STRUCTURE OF JUVENILE TAIWAN LOACH (*PARAMISGURNUS DABRYANUS* SSP. TAIWAN)

水生生物学报. 2021, 45(2): 267–274 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.281>

饲料中添加谷胱甘肽对黄颡鱼幼鱼组织谷胱甘肽含量、免疫及抗氧化性能的影响

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH GLUTATHIONE ON TISSUE GSH LEVEL, IMMUNITY, AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF JUVENILE YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2018, 42(4): 728–735 <https://doi.org/10.7541/2018.089>

日粮中添加桑叶提取物和1-脱氧野尻霉素对大鲵生长、消化、免疫能力和肠道菌群的影响

EFFECTS OF DIETARY MULBERRY LEAF EXTRACT AND 1-DEOXYNOJIRIMYCIN ON GROWTH, DIGESTION AND IMMUNITY CAPACITY, AND INTESTINAL MICROORGANISM OF CHINESE GIANT SALAMANDER (*ANDRIAS DAVIDIANUS*)

水生生物学报. 2021, 45(3): 582–592 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.116>

发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究

EFFECTS OF FERMENTED SOYBEAN MEAL ON THE GROWTH AND INTESTINAL HISTOLOGY AND MICROBIOTA OF JUVENILE LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

水生生物学报. 2018, 42(5): 919–928 <https://doi.org/10.7541/2018.113>

α -酮戊二酸对氨氮胁迫下草鱼鳃 Na^+/K^+ -ATP酶活性及血液生化指标的影响

EFFECTS OF α -KETOGLUTARATE ON GILL Na^+/K^+ -ATPASE ACTIVITY AND BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS OF GRASS CARP EXPOSURE TO AMMONIA

水生生物学报. 2018, 42(5): 996–1002 <https://doi.org/10.7541/2018.122>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2023.0054

氨氮胁迫对大口黑鲈幼鱼组织结构、酶活及肠道微生物的影响

魏孟申¹ 郑涛^{1,2} 路思琪² 强俊^{1,2} 陶易凡² 李岩² 徐跑^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214128; 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)

摘要: 为研究大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)幼鱼肝脏、肠道对氨氮胁迫的反应机制, 以大口黑鲈幼鱼(15.32±0.65) g为实验对象, 设置0、25和50 mg/L三个浓度(非离子氨浓度0、0.55和1.11 mg/L), 研究氨氮胁迫48h对大口黑鲈肝、肠组织结构、酶活性和肠道微生物的影响。结果显示, 胁迫48h后, 25和50 mg/L氨氮浓度胁迫均使肝组织出现肝细胞溶解空泡化、肝细胞排列紊乱等现象, 此外, 50 mg/L氨氮胁迫还使肠道产生杯状细胞增多, 绒毛宽度、肌层厚度增加等现象。25和50 mg/L组的肝组织中GPT及GOT活性较对照组显著下降; 肝组织LZM活性, 肠组织SOD活性、CAT活性和MDA含量显著高于对照组($P<0.05$)。50 mg/L组补体C3活性显著高于对照组($P<0.05$)。氨氮胁迫48h显著影响了大口黑鲈肠道微生物的Alpha多样性和Beta多样性。在门水平上, 与对照组相比, 50 mg/L组拟杆菌门和螺旋体门的相对丰度显著升高($P<0.05$)。在属水平上, 与对照组相比, 50 mg/L组不动杆菌属(*Acinetobacter*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和螺旋体属(*Brevinema*)的丰度显著升高, 邻单胞菌属(*Plesiomonas*)的丰度显著降低($P<0.05$)。BugBase表型预测结果显示革兰氏阴性菌在大口黑鲈肠道菌群中占绝对优势; 且50 mg/L组的肠道菌群具有更低的生物膜形成能力和耐应激性。研究表明, 氨氮胁迫会对大口黑鲈肝、肠组织造成损伤, 鱼体代谢和解毒能力下降; 抗氧化酶活性升高, 大口黑鲈发生氧化应激; 溶菌酶和补体C3活性上升, GOP和GPT活性降低, 非特异性免疫系统能力下降。同时, 肠道菌群构成改变, 菌群耐应激性降低, 肠道功能易损伤。研究结果将为解析氨氮对大口黑鲈的危害提供理论基础。

关键词: 氨氮胁迫; 抗氧化; 免疫; 肠道微生物; 大口黑鲈

中图分类号: S965.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2024)01-0010-13



氨氮是水产动物养殖水环境中的重要污染物之一, 以离子氨和非离子氨的形式存在, 非离子氨为主要毒性形式, 能引起养殖动物摄食降低、生长缓慢、免疫力差等现象^[1]。养殖用水多来自养殖地周边河道, 生活污水和工业废水的排放会导致河水氨氮浓度严重超标。有研究显示, 受污染的河水氨氮浓度可达25 mg/L, 严重的会超过40 mg/L^[2,3]。

长期暴露在高氨氮环境会引起水生动物机体抗氧化系统失衡, 引发免疫和代谢功能紊乱, 最终造成肝、肠组织损伤^[4]。氨氮胁迫能使鱼体产生过量的活性氧自由基(ROS), 导致机体产生氧化应激^[5]。

Yu等^[6]对拉氏鲮(*Rhynchocypris lagowskii*)的研究显示, 氨暴露会显著提高鱼体MDA含量, 增加SOD和CAT的活性, 引起氧化应激。此外, 相关研究表明, 氨氮还能够导致鱼体GPT、GOT、LZM和补体C3等免疫相关指标变化^[7,8], 影响非特异性免疫能力。环境中高浓度氨氮能够导致草鱼(*Ctenopharyngodon idell*)、淇河鲫(*Carassius auratus*)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)等鱼类脏器细胞出现核溶解和空泡化等现象, 造成组织损伤^[9-11]。

肠道是机体消化吸收的主要场所, 肠道菌群对宿主的免疫应答和内环境的稳定具有重要意义^[12]。

收稿日期: 2023-02-17; 修订日期: 2023-04-11

基金项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目(JBGS〔2021〕130); 江苏省加州鲈产业重大技术协同推广计划(2022-ZYXT-07); 苏州市科技计划项目(SNG2021009)资助 [Supported by the Jiangsu Seed Industry Revitalization “Unveil the List and Assume Leadership” Project (JBGS〔2021〕130); the Largemouth Bass Industrial Major Technologies and Collaborative Promotion Program of Jiangsu Province, China (2022-ZYXT-07); Suzhou Science and Technology Project (SNG2021009)]

作者简介: 魏孟申(1999—), 男, 硕士研究生; 研究方向为水产生物技术。E-mail: 1577786887@qq.com

通信作者: 强俊, 研究员; 研究方向为水产生物技术。E-mail: qiangj@ffrc.cn

水体环境的改变会使动物产生应激反应, 影响体内肠道微生物的结构^[13]。在杂交黄颡鱼(*P. fulvidraco*♀×*P. vachellii*♂)的研究中^[14], 运输过程中氨氮浓度上升会破坏肠道微生物的稳态, 引发氧化应激、代谢和免疫失调。16S rDNA高通量测序技术能快速地对不同属种的细菌进行分类鉴定^[15], 广泛应用于环境因子对肠道菌群结构影响的研究中^[16]。在大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)和瓦氏黄颡(*P. vachellii*)的研究中, 温度和低氧应激会破坏肠道菌群的稳定, 影响机体健康^[17, 18]。氨氮对鱼类肠道的影响不容忽视, 然而, 目前氨氮对大口黑鲈肠道微生物的影响尚不可知。

大口黑鲈*Micropterus salmoides*, 是从北美洲引进的一种优良淡水养殖品种, 具有养殖周期短、市场需求大和售卖价格高等优点。大口黑鲈的养殖多采用高密度集约化养殖模式, 该模式存在残饵溶解、鱼集中排泄等问题, 极易导致水体中氨氮浓度的急剧升高, 从而对鱼体产生胁迫, 影响鱼体的生长发育^[19]。氨氮胁迫干扰大口黑鲈氨的排泄, 减少分解代谢^[20]; 同时氨暴露会损害其鳃和肝等组织结构, 增加血清转氨酶活性与抗氧化酶活力, 抑制鱼体免疫和抗氧化能力^[21, 22]。然而, 目前对大口黑鲈肠道结构及肠道微生物的影响鲜有报道。本实验通过对大口黑鲈进行氨氮胁迫, 研究氨氮对其肝和肠组织结构的影响, 分析胁迫对鱼体抗氧化和免疫能力及肠道菌群的影响, 为全面评估和解析氨氮对鱼类的危害提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大口黑鲈幼鱼由苏州金澄福生物科技有限公司(中国苏州)提供。挑选同一批次、生长健康状况良好的鲈幼鱼[(15.32±0.65 g)]180尾进行实验。实验开始前, 于100 L养殖缸内暂养7d。在暂养期间, 水温25—26℃, 溶氧>7 mg/L, pH为7.5±0.2。用NH₄Cl(分析纯)配制成10 g/L的母液, 实验时根据养殖缸中水的体积加入母液, 达到所需实验浓度。

1.2 氨氮暴露实验设计

实验在体积100 L养殖缸内进行, 依据养殖水源可能达到的氨氮浓度^[2, 3]和大口黑鲈48h半致死氨氮浓度(LC₅₀)^[23], 设置0、25和50 mg/L三个浓度组(非离子氨浓度0、0.55和1.11 mg/L), 实测值分别为(0.37±0.08)、(25.19±0.51)和(50.47±0.46) mg/L [非离子氨浓度(0.008±0.002)、(0.59±0.011)和(1.12±0.01) mg/L], 每组设3个平行, 每个平行放养实验大

口黑鲈20尾。在实验过程中, 每隔4h用纳氏试剂分光光度法^[24]对实验水体进行氨氮浓度测定, 根据具体结果用母液及时调节。实验期间, 水温保持25—26℃, pH为7.5±0.15, 溶氧(7.57±0.46) mg/L。

氨氮胁迫48h取样, 每个平行取4尾使用MS-222麻醉后解剖, 迅速取出肝脏和前肠, 液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存, 用于酶活测量。同时, 每个浓度组另取肝脏、前肠样品3份, 用4%多聚甲醛固定, 用于组织切片观察。0和50 mg/L浓度组各取6尾, 取出前肠放入冻存管(记为NAN和AN50), 液氮冷冻后放入-80℃冰箱保存, 用于肠道微生物测定。

1.3 HE染色切片

4%多聚甲醛浸泡固定的组织, 进行石蜡包埋处理并切片, 通过二甲苯脱蜡, 再使用苏木素-伊红染色, 待切片风干后封片, 使用光学显微镜(OLYMPUS CX22LED)进行观察^[25]。使用Image J软件计算空泡细胞面积占据切片面积的比例, 得出空泡率; 使用Image-Pro Plus 6.0软件测量肠道绒毛高度、绒毛宽度和肌层厚度。

1.4 Elisa检测

待测样品吸干表面水分, 称取0.1 g左右, 按照1:9比例加入已预冷磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS), 制成组织匀浆, 在4℃, 9000 r/min条件下离心15min。取上清, 用于生化指标检测。根据上海朗顿生物科技有限公司ELISA试剂盒的说明, 检测肝组织中谷丙转氨酶(Glutamic pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase, GOT)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)和补体C3(Complement3, C3), 肠组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD), 过氧化氢酶(Catalase, CAT)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的活性, 使用全波段酶标仪(Bio-Tek EonTM)对所有指标进行检测。

1.5 肠道微生物总 DNA 提取和测序

使用E.Z.N.A.粪便DNA试剂盒(D4015)提取肠道样本总DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量。PCR扩增使用V3—V4区域通用引物341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'及805R: 5'-GAC TACHVGGGTATCTAATCC-3'。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR扩增程序: 98℃预变性30s, 32次循环(在98℃下变性10s, 在54℃下退火30s, 在72℃下延伸45s); 最后在72℃下延长10min。使用Ampure XT beads对PCR产物进行纯化, 并通过Qubit定量。使用Illumina (Kapa Biosciences, Woburn, MA, USA)文库定量试剂盒和Agilent 2100生物分析仪(Agilent, USA)评估扩增子文库的大小及

数量。

在Illumina NovaSeq平台上对样本进行测序,通过FLASH合并匹配端读取。在特定的过滤条件下,使用Fqtrim(v0.94)对原始读数据进行质量过滤,以获得高质量的clean标签。使用Vsearch软件(v2.3.4)过滤嵌合序列。特征表和特征序列由DADA2进行解调获得。Alpha多样性和Beta多样性由QIIME2计算出来,利用Bugbase数据库进行细菌表型预测。

1.6 数据处理及统计分析

非离子氨浓度^[26]计算公式:

$$C_1 = 1.216 \times f \times C_2 / 100$$

$$f = 100 / [10^{(pK_a - pH)} + 1]$$

$$pK_a = 0.09018 + 2729.92 / T$$

$$T = 273.15 + t$$

式中, C_1 为非离子氨浓度(mg/L), f 为氨的水溶液中非离子氨的摩尔百分比(%), C_2 为氨氮浓度(mg/L), T 为绝对温度(K), t 为摄氏温度(°C)。

实验所得数据用SPSS26.0软件进行分析处理。使用Shapiro-Wilk和Levene检验分析酶活数据的正态性和方差同质性,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和Duncan检验法统计分析各组间数据差异显著性。用Wilcoxon秩和检验确定了样品间Alpha多样性和相对丰度差异的显著性,通过QIIME2分析Beta多样性并用R(v3.5.2)包绘制图片。显著差异肠道菌群的筛选使用LefSe分析,设

定 $P < 0.05$, $LDA > 3$ 。结果均以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 氨氮胁迫48h后大口黑鲈组织的显微观察

通过显微观察发现,在氨氮胁迫48h后,0组肝组织中央静脉周围肝细胞排列整齐,肝细胞结构清晰完整,细胞间界限明显(图1A和1D)。25 mg/L组肝细胞排列出现紊乱,部分细胞出现空泡化(图1B和1E)。50 mg/L组肝细胞肿胀,排列紊乱,大量肝细胞空泡化(图1C和1F)。0、25和50 mg/L组肝细胞空泡率分别为(23.61±1.39)%、(47.72±0.55)%和(69.8±1.38)%,差异显著($P < 0.05$)。

通过对肠组织显微结构的测量与分析(图2)可知,在氨氮胁迫48h后,25和50 mg/L组肠组织杯状细胞的数量增加,杯状细胞体积逐渐变大。对照组和各实验组的绒毛高度无显著性差异($P > 0.05$;表2)。0和25 mg/L组的绒毛宽度无显著性差异($P > 0.05$),50 mg/L组的绒毛宽度显著高于0和25 mg/L组($P < 0.05$);50 mg/L组的肌层厚度显著高于0组($P < 0.05$),与25 mg/L组差异不显著($P > 0.05$;表1)。

2.2 氨氮胁迫48h后大口黑鲈组织抗氧化及免疫参数的变化

氨氮胁迫对大口黑鲈组织抗氧化酶及非特异性免疫酶活性产生显著影响(图3和图4)。胁迫48h后肠组织中SOD活性和CAT活性显著升高($P <$

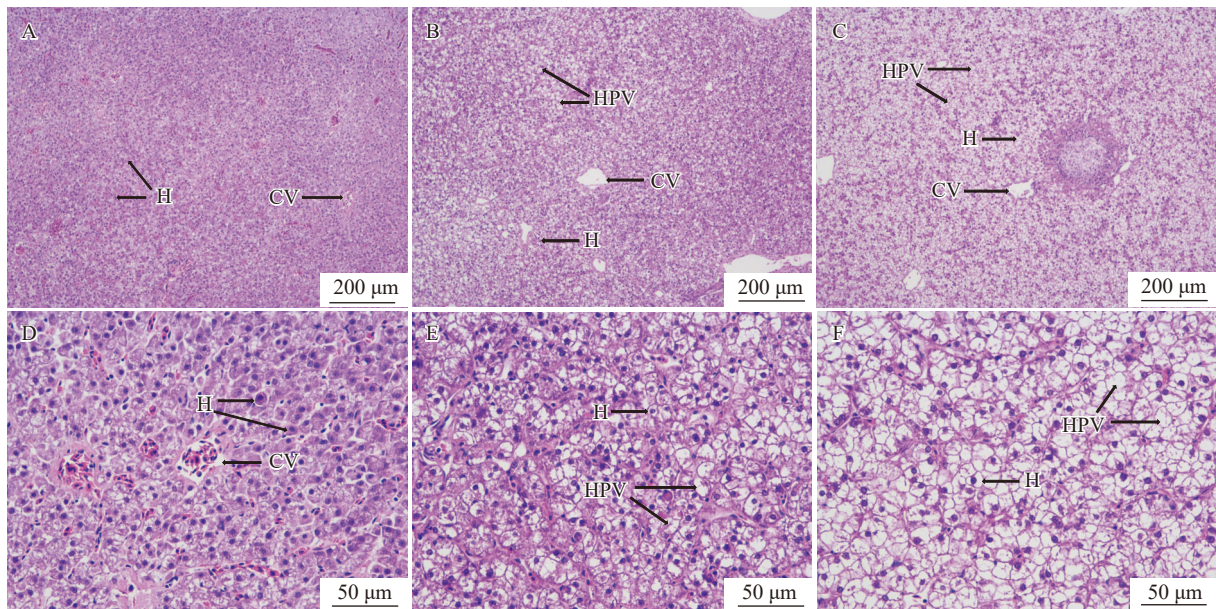


图1 氨氮胁迫48h对大口黑鲈肝组织显微结构的影响

Fig. 1 Effects on liver microstructure of *Macropterus salmoides* under 48h ammonia-N stress

CV. 中央静脉; H. 肝细胞; HPV. 肝细胞空泡化

CV. central venous; H. hepatocyte; HPV. hepatocyte vacuolation

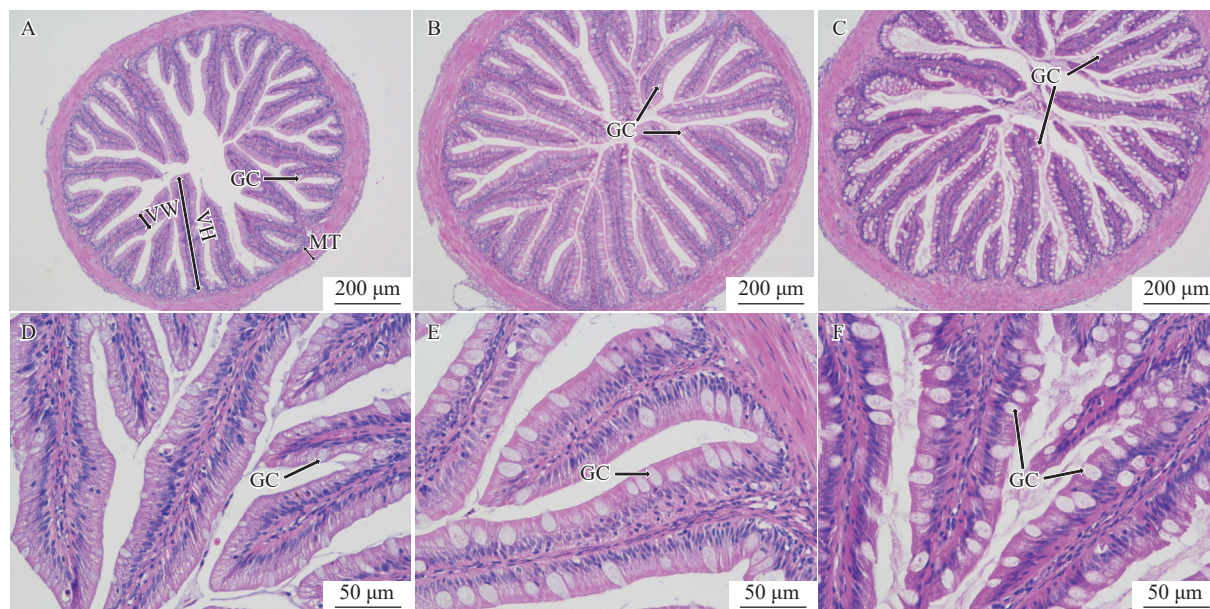


图2 氨氮胁迫48h对大口黑鲈肠组织显微结构的影响

Fig. 2 Effects on intestinal microstructure of *Macropodus salmoides* under 48h ammonia-N stress

VH. 绒毛高度; VW. 绒毛宽度; MT. 肌层厚度; GC. 杯状细胞

VH. villus height; VW. villus width; MT. muscle thickness; GC. goblet cells

表1 氨氮胁迫48h对大口黑鲈肠道组织的影响

Tab. 1 Effects on intestinal tissue of *Macropodus salmoides* under 48h ammonia-N stress (μm)

处理 Treatment	绒毛高度 Villus height	绒毛宽度 Villus width	肌层厚度 Muscle thickness
0	328.06 $\pm$ 8.46	69.16 $\pm$ 3.17 ^b	69.41 $\pm$ 1.39 ^b
25 mg/L	336.17 $\pm$ 5.35	69.25 $\pm$ 1.10 ^b	70.43 $\pm$ 1.39 ^{ab}
50 mg/L	333.48 $\pm$ 9.41	79.58 $\pm$ 0.92 ^a	73.97 $\pm$ 0.96 ^a

注: 同一列不同上标字母表示相同氮浓度下不同胁迫时间差异显著($P<0.05$)Note: Different superscripts at the same column mean significant difference ($P<0.05$)

0.05); 50 mg/L组SOD活性显著低于25 mg/L组, CAT活性显著高于25 mg/L组($P<0.05$), 25和50 mg/L组MDA含量显著大于0组($P<0.05$)。肝组织中25和50 mg/L组GPT及GOT活性较0组显著下降($P<0.05$), 25和50 mg/L组LZM活性显著高于对照组($P<0.05$), 25和50 mg/L组无明显差异; 50 mg/L组补体C3活性显著高于0组($P<0.05$), 25 mg/L组高于0组但差异不显著($P>0.05$)。

2.3 氨氮胁迫48h后大口黑鲈肠道菌群的变化

本实验收集了12个样本进行测序, 总共获得了合格的16S rDNA序列546249条, 通过双端拼接、质量控制和嵌合体过滤等方式修正错误, 共得到1166个OUT。测序所得数据可以覆盖样本绝大多数物种, 可以进行后续分析。

Alpha多样性主要用来反映物种丰富度和均匀

度(图5)。通过测定观察到NAN组的chao1指数(图5A)、observed_outs指数(图5B)、shannon指数(图5C)和simpson指数(图5D), 均显著低于AN50组($P<0.05$), 肠道菌群的丰富度降低。

对12个样本的主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)如图6所示。不同颜色代表不同分组, 不同样本间的距离代表其物种组成的差异情况。AN50组和NAN组样本间区分明显, 具有显著差异($P<0.05$), 氨氮胁迫48h后大口黑鲈肠道微生物结构发生明显改变。

韦恩图能反映不同组共有和特有的特征值数目, 对AN50组和NAN组所测feature进行分析发现(图7), AN50组和NAN组共有的feature有196个, 占总feature的16.8%, 而AN50组和NAN组特有的feature数量相差较大, 分别为709(60.8%)和261(22.4%)。同时, 用曼哈顿图来展示差异feature分析(图8)。结果显示, 差异feature主要集中在拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)和螺旋体门(Spirochaetes), 变形菌门(Proteobacteria)同时存在上升和下降的feature。

对样本中平均相对丰度大于1%的feature进行相对丰度和差异分析(图9)。在门水平上(图9A), 主要的优势菌群是变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、螺旋体门(Spirochaetes)和厚壁菌门(Firmicutes)。由

图 9B 可知, 在氨氮胁迫 48h 后, AN50 组和 NAN 组在拟杆菌门和螺旋体门的相对丰度上存在显著差异 ($P < 0.05$), AN50 组显著高于 NAN 组; 梭杆菌门和厚壁菌门存在一定差异 ($P > 0.05$)。在属水平上(图 9C), 相对丰度大于 1% 的属有 8 个, 分别为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、螺旋体属(*Brevinema*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。经差异分析(图 9D)和 LEfSe 分析(图 9E)可以发现, 在 8 个优势菌属中 4 个存在显著差异 ($P < 0.05$)。AN50 组不动杆菌属、金黄杆菌属和螺旋体属的丰度显著高于 NAN 组, 邻单胞菌属的丰度显著低于 NAN 组 ($P < 0.05$)。

通过相关性热图来分析相对丰度前 20 的属与肠道生理指标的关系(图 10)。结果发现, 不动杆菌属与肠道 MDA 含量、CAT 活性、绒毛宽度和肌层厚度呈正相关, 金黄杆菌属与肠道肌层厚度、绒毛宽度及 SOD 活性呈正相关, 黄杆菌属与肠道肌层厚度、绒毛宽度呈正相关。假单胞菌属、短波单胞菌属、寡养单胞菌属与肠道 MDA 含量呈正相关。邻单胞菌属与肠道 MDA 含量、CAT 活性、绒毛宽度和肌层厚度呈负相关。

为了进一步了解氨氮胁迫对大口黑鲈肠道微

生物的菌群的影响, 对肠道菌群表型进行分析, 使用 BugBase 对细菌表型进行预测, 深入探究氨氮胁迫对肠道微生物菌群的表型和功能的影响(图 11)。AN50 组和 NAN 组在革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌方面没有显著差异, 革兰氏阴性菌在肠道菌群中占绝对优势。同时, AN50 组具有更低的生物膜形成能力和耐应激性。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫影响大口黑鲈肝脏、肠道组织的正常结构和功能

肝脏是新陈代谢和解毒的主要器官, 水体氨氮浓度的升高, 会造成肝组织的损伤^[27]。在本实验中, 氨氮对大口黑鲈肝脏最主要的组织结构影响表现为肝细胞排列紊乱和肝细胞空泡化, 并且随着氨氮浓度增加, 肝细胞空泡化更加严重。在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)的氨氮胁迫实验中, 同样出现肝细胞空泡化的现象^[28, 29]。细胞空泡化是细胞坏死的前兆^[30]。同时, 肝脏中存在多种酶, 对鱼体的生长代谢有重要作用^[31], 而肝细胞空泡可能会对酶活性产生影响, 从而导致肝脏的正常功能损伤。

鱼类的肠道具有屏障功能^[32]。在本实验中, 杯状细胞数量在胁迫后显著增加; 50 mg/L 组的肠道

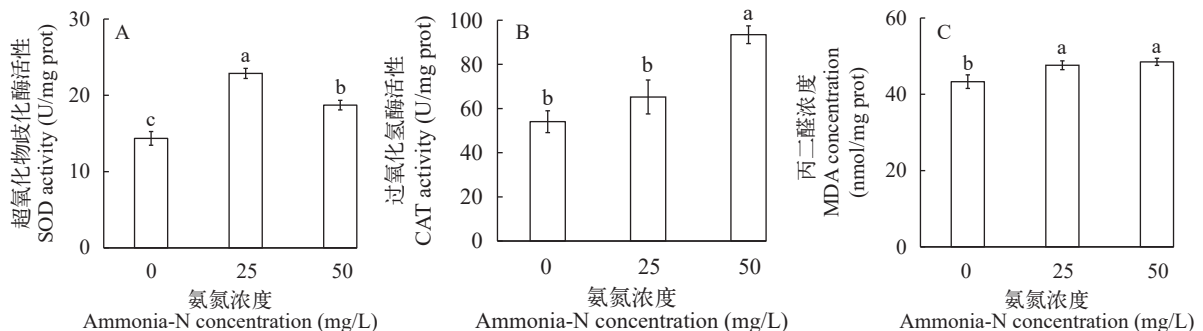


图 3 氨氮胁迫 48h 对大口黑鲈组织抗氧化酶的影响

Fig. 3 Effects of antioxidant enzymes on tissue of *Macropterus salmoides* under 48h ammonia-N stress

同一图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different superscripts at the same figure mean significant difference ($P < 0.05$), the same applies below

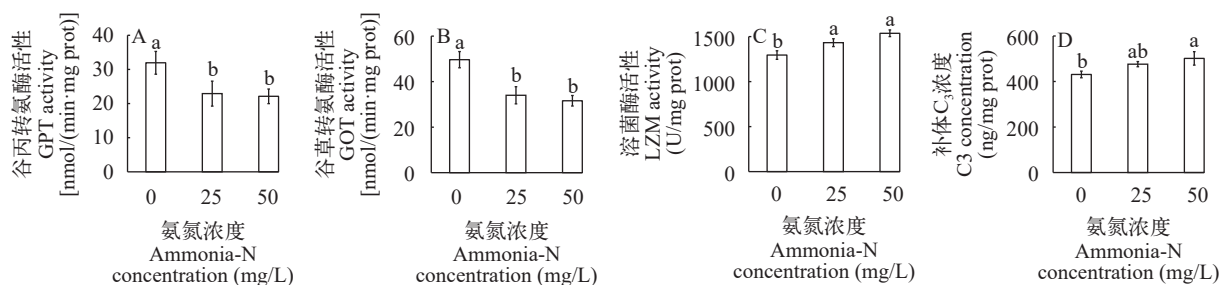


图 4 氨氮胁迫 48h 对大口黑鲈非特异性免疫酶的影响

Fig. 4 Effects on non-specific immunoenzymes of *Macropterus salmoides* under 48h ammonia-N stress

绒毛肿胀, 绒毛宽度显著大于对照组和25 mg/L组, 且肠道肌层厚度显著大于对照组。在急性氨胁迫对草鱼肠道影响的研究中^[33], 肠道出现同样的变化。肠道内的杯状细胞数量增多, 会促使肠道黏液分泌增多, 以达到保护肠道减少损伤的目的^[34]。绒毛宽度和肌层厚度增加可能是肠道产生炎症的预兆, 氨暴露可诱导氧化应激和炎症, 改变鱼体酶活性, 进而损伤肠道^[33, 35]。因此, 高浓度的氨氮可能会引起肠道的炎症反应, 肠道通过促进杯状细胞分裂应对氨氮胁迫带来的影响, 从而影响肠道的结构与功能。

3.2 氨氮胁迫造成大口黑鲈氧化应激

在水体中氨氮浓度升高时, 鱼体内发生一系列应激反应而产生大量ROS; MDA 是ROS脂质过氧化反应的产物^[36], 氨氮胁迫后肠组织中的MDA含量显著增加, 导致细胞的正常功能受损。SOD和CAT是机体抗氧化系统的重要组成部分, 能有效清除ROS^[37]。胁迫后SOD和CAT活性也明显高于对照组, 去清除过多的ROS, 以减轻过氧化损伤。这与翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)的研究结果一致^[38]。而50 mg/L组SOD活性较25 mg/L组低, 可能是因为胁迫产生的有害物质超过了鱼体的耐受上限。孙丽颖等^[39]对黄颡鱼的研究发现, 过高的氨氮浓度会抑制抗氧化酶活性。氨氮胁迫抑制鱼体的调节能力, 抗氧化功能被削弱, 从而可能影响

肠道的结构和功能, 这与肠道组织切片的结果一致。

3.3 氨氮胁迫影响大口黑鲈非特异性免疫相关酶活性及免疫能力

LZM是鱼类先天免疫的重要防御因子, 是反映鱼类免疫毒性的常规指标^[40]。LZM能激活机体的补体系统^[41]; C3是补体系统的主要成分, 在抵抗病原感染和炎症反应方面起着重要作用^[42]。在本实验中, 氨氮胁迫刺激大口黑鲈合成或分泌LZM, 增强LZM活性, 进而激活补体系统促进补体C3活性上升, 加强非特异性免疫, 以应对氨氮带来的毒性作用。鲤(*Cyprinus carpio*)^[43]和异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[44]的研究也出现相同现象。

GPT和GOT是动物体内广泛存在的重要的转氨酶, 通常用这两种酶的活性检测氨基酸的代谢情况并反映肝脏的功能状况。在正常情况下, GPT和GOT存在于细胞内, 只有极少数释放入血液中^[45]。在本研究中, 氨氮胁迫后, 两实验组的GPT和GOT活性均显著低于对照组。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的研究^[46]也发现, 氨氮胁迫会降低组织中GPT和GOT的浓度。其原因可能是氨氮胁迫使肝细胞受到损伤, 细胞膜通透性增加, 转氨酶释放到血液里所致, 氨基酸代谢因此受到抑制。

3.4 氨氮胁迫改变大口黑鲈肠道微生物的组成及功能

在外界环境胁迫条件下, 鱼类肠道菌群结构会

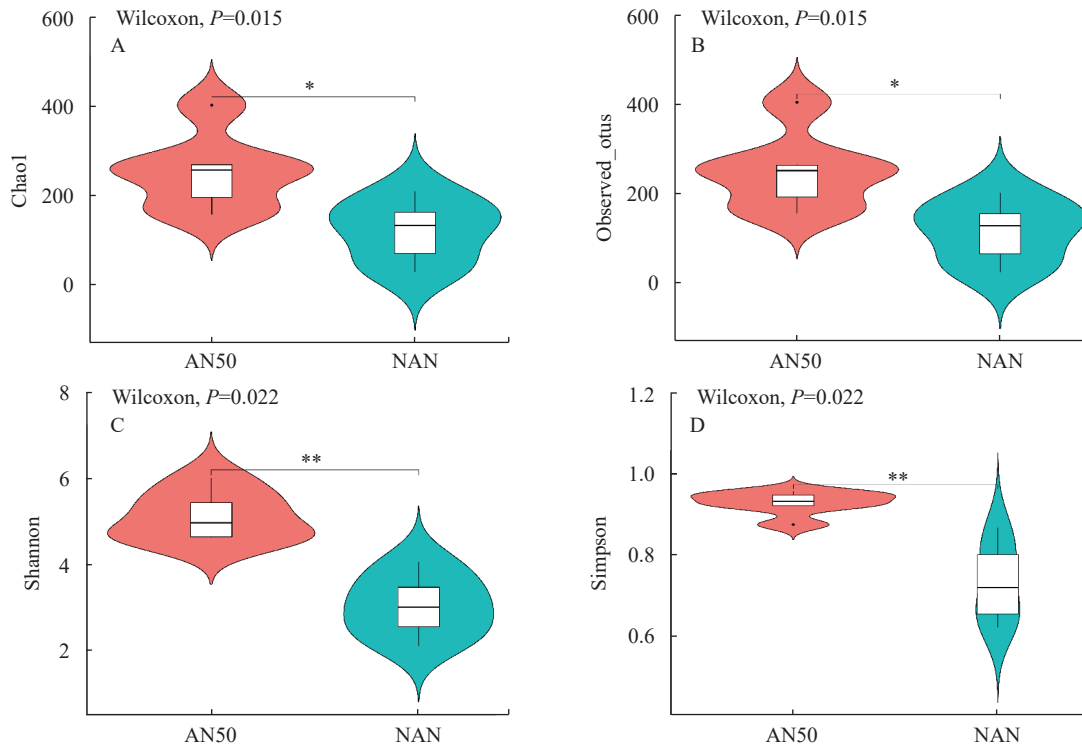


图5 氨氮胁迫48h肠道微生物Alpha多样性指数

Fig. 5 Alpha diversity under 48h ammonia-N stress

发生一定程度的改变^[47, 48]。氨氮胁迫后Alpha多样性和Beta多样性显著变化, 微生物菌群有明显的聚类特征, 菌群差异显著。在戚晓舟^[49]对鲫的氨氮胁迫研究中, 也出现胁迫组物种丰度提高, 肠道菌群结构改变的现象。Khan等^[50]对中华花龟(*Mauremys sinensis*)的研究也发现, 在氨胁迫下肠道微生物Beta多样性差异显著, 影响了肠道菌群的组成。这说明氨氮胁迫使肠道微生物群丰度产生差异, 肠道菌群结构发生变化, 而肠道菌群结构变化易造成宿主生理功能的异常^[51]。

在氨氮胁迫后, 大口黑鲈肠道内变形菌门、梭

杆菌门、拟杆菌门、螺旋体门和厚壁菌门占据优势, AN50组的螺旋体门和拟杆菌门相对丰度显著高于NAN组。有研究指出, 变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌门和厚壁菌门是淡水鱼类肠道微生物群的重要组成部分^[52]。螺旋体广泛分布在自然界和动物体内, 多通过寄生引起疾病。在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)的相关研究中, 螺旋体门是其肠道微生物菌群的优势菌群之一^[53, 54], 但是关于螺旋体如何对淡水鱼产生影响的研究尚少, 其对鱼体结构、功能的作用有待进一步探究。

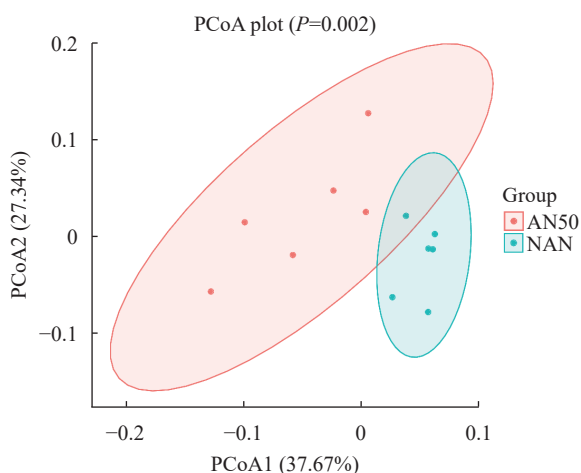


图6 氨氮胁迫48h肠道微生物PCoA分析

Fig. 6 Principal coordinates analysis of intestinal microbiome under 48h ammonia-N stress

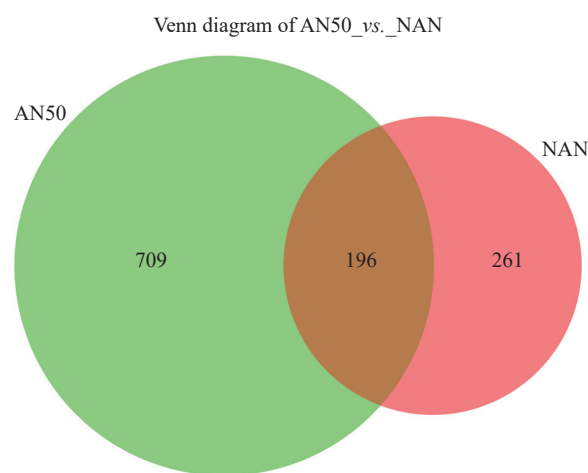


图7 氨氮胁迫48h feature 韦恩图

Fig. 7 Venn diagram showing feature under 48h ammonia-N stress

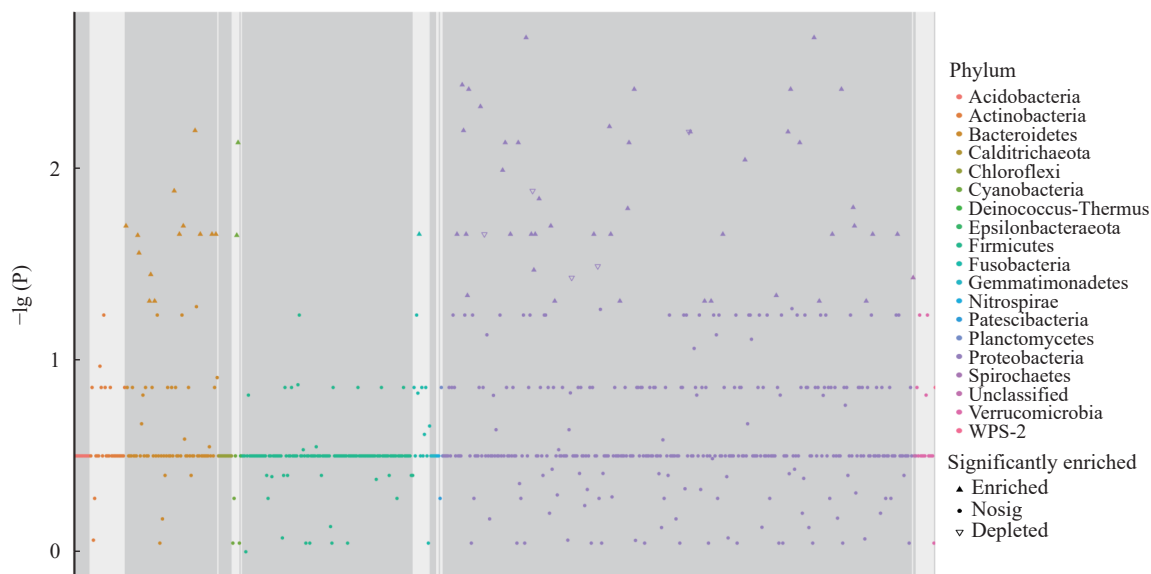


图8 氨氮胁迫48h feature曼哈顿图

Fig. 8 Manhattan plots showing enriched and depleted feature under 48h ammonia-N stress

圆形代表没有显著差异的feature, 实三角形代表显著上升的feature, 空三角形代表显著下降的feature, 不同颜色表示feature所属的门。Feature that has no significant difference are depicted as circular. Feature that are significantly enriched and depleted are depicted as solid triangle and hollow triangle. Different colors represent the different taxonomic groups (Phylum level)

拟杆菌门的菌群多生活在动物的肠道中, 为条件致病菌, 参与肠道中糖类、蛋白质的代谢^[55], 与肠道炎症密切相关^[53]。厚壁菌门和拟杆菌门的比例可用来表示动物的肥胖程度, 厚壁菌门和拟杆菌门的相互作用对鱼类肠道的能量代谢起着重要的作用^[56]。在本研究中, 厚壁菌门和拟杆菌门的比例降低, 可能削弱鱼体能量代谢。金黄杆菌属在本实验中是优势菌属, 是一类革兰氏阴性菌, 属于拟杆菌门, 会引起水产动物的疾病^[57]。王鑫毅等^[58]对乌

鳢(*Channa argus*)的研究发现, 金黄杆菌属有比较强的毒性, 鱼类感染金黄杆菌属会出现鳞片脱落、肝肿大和肠组织黏连等症状。氨氮胁迫后拟杆菌门和金黄杆菌属丰度的增加, 可能引起大口黑鲈肠道损伤, 破坏能量平衡, 影响鱼体生长代谢。

变形菌门是细菌中最大的一个门, 同时也包含了大量的病原菌。在氨氮胁迫后, 变形菌门相对丰度总体没有显著变化, 其门下的不动杆菌属和邻单胞菌属丰度差异显著, 不动杆菌属显著增多, 邻单

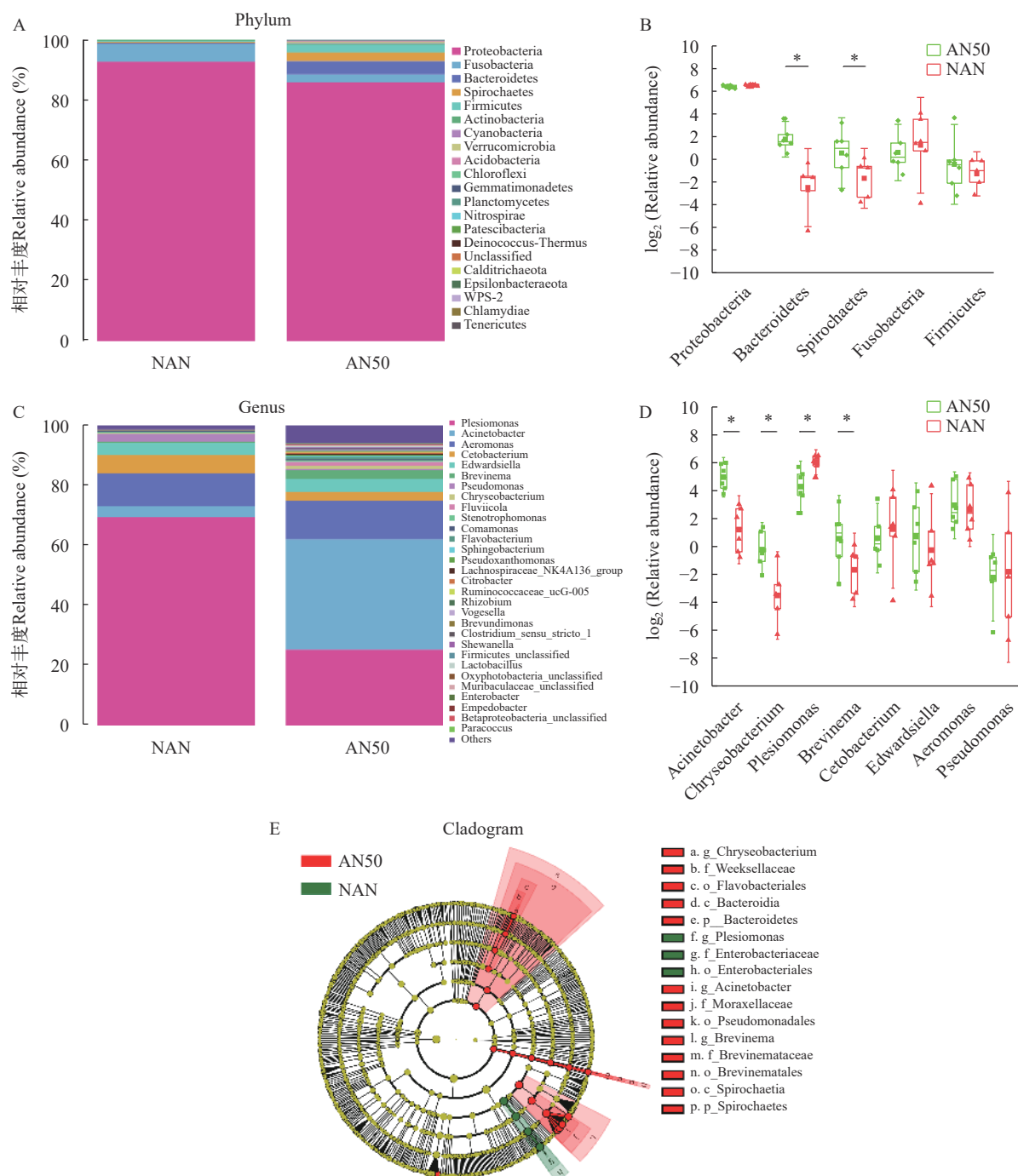


图9 氨氮胁迫48h肠道微生物的优势菌相对丰度和差异分析

Fig. 9 Relative abundance and difference analysis of intestinal microbiome under 48h ammonia-N stress

胞菌属则显著减少。不动杆菌感染多出现在犬科动物和人上,近年来常出现在鱼类中,其致病性被广泛研究^[59, 60]。不动杆菌属感染可能会导致团头鲂出现鳞片脱落、肝脏发白和肝细胞肿胀空泡等症状^[61],氨氮胁迫后不动杆菌属的增多可能导致大口黑鲈组织损伤。邻单胞菌属常见于鱼类、水生动物和各种哺乳动物消化道内,发病时对鱼类等水产动物造成极大危害^[62]。然而氨氮胁迫降低了邻单胞菌属丰度,使大口黑鲈因邻单胞菌属产生疾病的可能降低。

氨氮胁迫会引起大口黑鲈肠道菌群功能的差异。AN50组和NAN组的优势菌群均是革兰氏阴性菌,占到相对丰度的90%以上。革兰氏阴性菌是鱼类肠道微生物的优势菌群,也存在一部分革兰氏阳性菌^[63]。同时,AN50组有较低的生物膜形成能力和耐应激性。微生物生物膜是由微生物群体及其包被的细胞外多聚物和基质网组成,生物膜形成后

细菌对宿主免疫防御机制的抵抗力也会增强^[64, 65]。氨氮胁迫会使大口黑鲈肠道微生物的生物膜形成能力降低,不利于菌群在肠道中的生存,减少了因肠道菌群致病的可能。肠道菌群的耐应激性更低,说明氨氮浓度高时,大口黑鲈肠道容易受到影响,菌群平衡破坏,进而影响鱼体健康。

4 结论

本实验结果表明,氨氮胁迫使大口黑鲈的肝脏、肠道组织结构发生变化,同时氨氮胁迫后肠道微生物结构被破坏,引起大口黑鲈肝脏、肠道损伤,破坏能量平衡,影响鱼体生长代谢。随水体氨氮浓度的升高,MDA含量增多,SOD、CAT、LZM和补体C3活性升高,GOT和GPT活性降低,使大口黑鲈产生氧化应激,并降低其非特异性免疫能力。在氨氮胁迫后,肠道菌群生物膜形成能力和菌群耐应激性降低,大口黑鲈肠道更容易受到损伤。在进行大

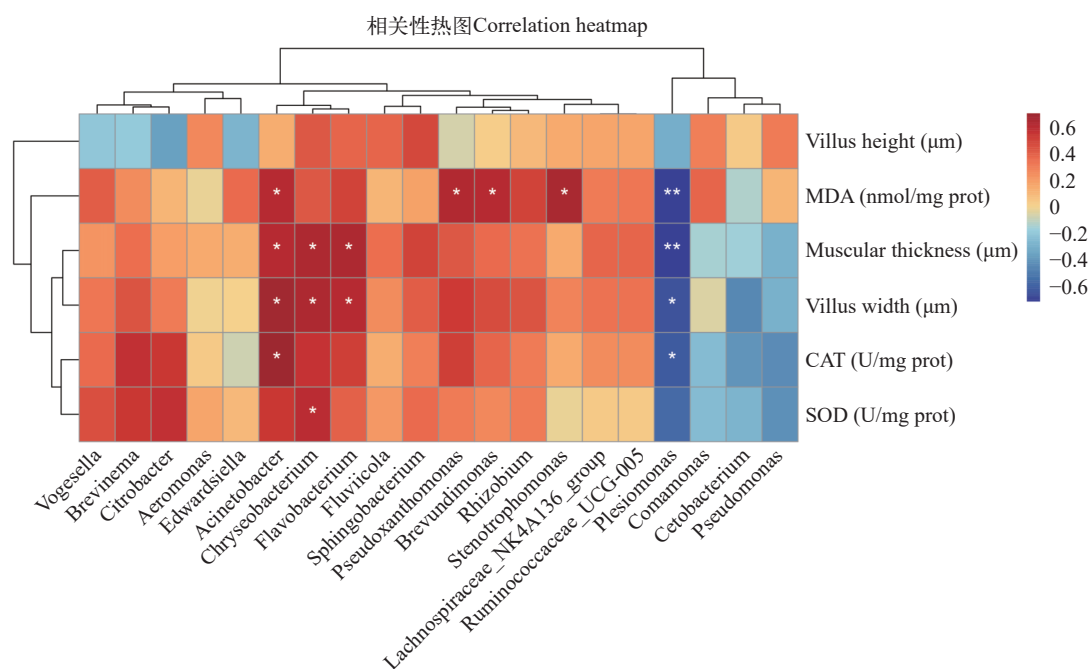


图 10 肠道微生物属水平与肠道生理指标的相关性

Fig. 10 Relationships between intestinal microbiome at genus level and intestinal physiological indexes

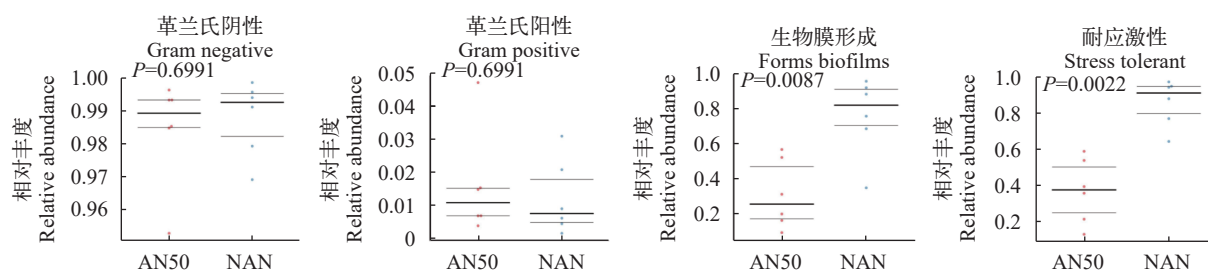


图 11 BugBase预测得到的氨氮胁迫48h肠道菌群表型分析

Fig. 11 Phenotype analysis of intestinal microbiome under 48h ammonia-N stress predicted by BugBase

口黑鲈养殖时, 应密切注意养殖水体氨氮浓度的监测和管理, 防止氨氮对大口黑鲈幼鱼的毒性效应。

参考文献:

- [1] Maltez L C, Stringhetta G R, Enamorado A D, *et al.* Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, **43**(6): 1747-1759.
- [2] Jing H W, Zhang Z G, GUO J. Water pollution characteristics and pollution sources of Bei Canal river system in Beijing [J]. *China Environmental Science*, 2013, **33**(2): 319-327. [荆红卫, 张志刚, 郭婧. 北京北运河水系水质污染特征及污染来源分析 [J]. *中国环境科学*, 2013, **33**(2): 319-327.]
- [3] Tan B Q, Wu P R, Song G J. Water pollution and control of the Huaihe River Basin [J]. *Water Resources Protection*, 2005, **21**(6): 8-14. [谭炳卿, 吴培任, 宋国君. 论淮河流域水污染及其防治 [J]. *水资源保护*, 2005, **21**(6): 4-10.]
- [4] Chen Y Y, Sim S S, Chiew S L, *et al.* Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress [J]. *Aquaculture*, 2012(370/371): 26-31.
- [5] Storey K B. Oxidative stress: animal adaptations in nature [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996, **29**(12): 1715-1733.
- [6] Yu Z, Wu X Q, Zheng L J, *et al.* Effect of acute exposure to ammonia and BFT alterations on *Rhynchocypris lagowski*: Digestive enzyme, inflammation response, oxidative stress and immunological parameters [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020(78): 103380.
- [7] Xu X H, Zhang Y Q, Yan B L, *et al.* Effects of ammonia-N stress on immunity-related indicators and histological structure of some organs of the marine crab, *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, **34**(14): 3885-3894. [许星鸿, 张雁秋, 阎斌伦, 等. 氨氮胁迫对日本蟳免疫生理指标及器官结构的影响 [J]. *生态学报*, 2014, **34**(14): 3885-3894.]
- [8] Chen J Z, Zang X L, Hu G D. The immune response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in different ammonia [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, **20**(4): 629-634. [陈家长, 臧学磊, 胡庚东, 等. 氨氮胁迫下罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*) 机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响 [J]. *生态环境学报*, 2011, **20**(4): 629-634.]
- [9] Zhao C, Xu J, Xu X, *et al.* Organ-specific responses to total ammonia nitrogen stress on juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, **26**(11): 10826-10834.
- [10] Wu L M, Xu Y F, Li Y J, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen exposure on brain, gill, liver, and kidney histology of Qi River crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, **27**(7): 789-800. [吴利敏, 徐瑜凤, 李永婧, 等. 急性氨氮胁迫对淇河鲫鱼幼鱼脑、鳃、肝、肾组织结构的影响 [J]. *中国水产科学*, 2020, **27**(7): 789-800.]
- [11] Chen Q, Zhao H, Huang Y, *et al.* Effects of dietary arginine levels on growth performance, body composition, serum biochemical indices and resistance ability against ammonia-nitrogen stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Animal Nutrition*, 2016, **2**(3): 204-210.
- [12] Liu C, Zhao L P, Shen Y Q. A systematic review of advances in intestinal microflora of fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021: 1-13.
- [13] Llewellyn M S, Boutin S, Hoseinifar S H, *et al.* Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014(5): 207.
- [14] Zheng T, Tao Y, Lu S, *et al.* Integrated transcriptome and 16S rDNA analyses reveal that transport stress induces oxidative stress and immune and metabolic disorders in the intestine of hybrid yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*♀ × *Pseudobagrus vachellii*♂) [J]. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 2022, **11**(9): 1737.
- [15] Woo P C Y, Lau S K P, Teng J L L, *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, **14**(10): 908-934.
- [16] Xu S Y, Chen K C, Luo Q, *et al.* Microbial community in intestine of snakehead based on 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2020, **35**(5): 693-700. [徐晟云, 陈昆慈, 罗青, 等. 基于16S rRNA高通量测序的鳢肠道微生物群落结构研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2020, **35**(5): 693-700.]
- [17] Liu Y L, Lü H R, Li H D, *et al.* Effect of temperature on intestinal flora composition of *Paracloach macrolepis* [J]. *China Fisheries*, 2022(1): 94-97. [刘艳丽, 吕惠蓉, 李海东, 等. 温度对大鳞副泥鳅肠道菌群组成的影响研究 [J]. *中国水产*, 2022(1): 94-97.]
- [18] Zheng X, Fu D, Cheng J, *et al.* Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Aquaculture*, 2021(543): 736945.
- [19] Ruyet J P L, Lamers A, le Roux A, *et al.* Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters [J]. *Journal of Fish Biology*, 2003, **62**(4): 879-894.
- [20] Egnew N, Renukdas N, Ramena Y, *et al.* Physiological insights into largemouth bass (*Micropterus salmoides*) survival during long-term exposure to high environmen-

- tal ammonia [J]. *Aquatic Toxicology*, 2019(207): 72-82.
- [21] Zheng H W, Yang S Q, Sun Y, *et al.* Effects of exposure to acute ammonia nitrogen stress on ACP, CAT and MDA of juvenile *Macropterus salmoides* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2020, **39**(1): 27-33. [郑洪武, 杨斯琪, 孙颖, 等. 急性氨氮胁迫对大口黑鲈幼鱼ACP、CAT和MDA的影响 [J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, **39**(1): 27-33.]
- [22] Zou J, Hu P, Wang M, *et al.* Liver injury and metabolic dysregulation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after ammonia exposure [J]. *Metabolites*, 2023, **13**(2): 274.
- [23] Zheng H W. Effects of ammonia nitrogen stress on related organs and immune factors of *Micropterus salmoides* [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2020: 14-16. [郑洪武. 氨氮胁迫对大口黑鲈相关器官及免疫因子的影响研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2020: 14-16.]
- [24] Chen Z Q. Study on determination of ammonia nitrogen in water samples by Nessler's reagent spectrophotometry [J]. *Science and Technology Innovation*, 2020(11): 34-35. [陈志强. 纳氏试剂分光光度法测定水样中氨氮的研究 [J]. 科学技术创新, 2020(11): 34-35.]
- [25] Fischer A H, Jacobson K A, Rose J, *et al.* Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections [J]. *CSH Protocols*, 2008(5): pdb.prot4986.
- [26] Conversion method of nonionic ammonia in surface water environmental quality standard [J]. *Environmental Monitoring in China*, 1995(4): 9-21. [地面水环境质量标准非离子氨换算方法 [J]. 中国环境监测, 1995, **11**(4): 9-21.]
- [27] Xu Z, Cao J, Qin X, *et al.* Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review [J]. *Animals*, 2021, **11**(11): 3304.
- [28] Zhang W X, Sun S M, Ge X P, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(2): 233-244. [张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响 [J]. 水产学报, 2015, **39**(2): 233-244.]
- [29] Wang Z J, Chen S Q, Cao D Z, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, **38**(2): 59-69. [王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲃(*Verasper variegatus*)幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响 [J]. 渔业科学进展, 2017, **38**(2): 59-69.]
- [30] Safahieh A, Hedayati A, Savari A, *et al.* Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2012, **28**(7): 583-592.
- [31] Jiang L H, Wu H Y, Huang K E, *et al.* Effects of dietary carbohydrate levels on growth performance and liver metabolism functions of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(2): 245-255. [蒋利和, 吴宏玉, 黄凯, 等. 饲料糖水平对吉富罗非鱼幼鱼生长和肝代谢功能的影响 [J]. 水产学报, 2013, **37**(2): 245-255.]
- [32] Du Z, Zhu L, Dong M, *et al.* Effects of the ionic liquid [Omim]PF₆ on antioxidant enzyme systems, ROS and DNA damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(124/125): 91-93.
- [33] Cao S, Zhao D, Huang R, *et al.* The influence of acute ammonia stress on intestinal oxidative stress, histology, digestive enzymatic activities and PepT1 activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2021(20): 100722.
- [34] Yue D D, Yang R Y, Yang Y O. Effects of tea polyphenols on liver and intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by microscopic and ultrastructural observations [J]. *Journal of Yangtze University* (Natural Science Edition), 2019, **16**(11): 85-88. [岳鼎鼎, 杨睿毅, 杨严鸥. 茶多酚对草鱼肝脏和肠道影响的显微超微观察 [J]. 长江大学学报: 自科版, 2019, **16**(11): 85-88.]
- [35] Zhang W, Xia S, Zhu J, *et al.* Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* exposed to chronic ammonia [J]. *Aquaculture*, 2019(506): 424-436.
- [36] Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: facts and artifacts [J]. *Plant Physiology*, 2019, **180**(3): 1246-1250.
- [37] Cao L, Huang W, Shan X, *et al.* Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, **33**(1): 16-25.
- [38] Liu Y, Ding W D, Cao Z M, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on antioxidant enzymes activity and gene expression involved in inflammation of juvenile *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, **50**(8): 1860-1868. [刘雨, 丁炜东, 曹哲明, 等. 急性氨氮胁迫对翘嘴鲈幼鱼抗氧化酶活性及炎症反应相关基因表达的影响 [J]. 南方农业学报, 2019, **50**(8): 1860-1868.]
- [39] Sun L Y, Zhang M Z, Li M, *et al.* Effects of acute ammonia stress on antioxidant enzyme activity and mRNA expression levels of HSP70 and HSP90 genes in tissues of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(5): 707-714. [孙丽颖, 张木子, 黎明, 等. 急性氨氮胁迫对黄颡鱼组织抗氧化酶活性及HSP70和HSP90基因mRNA表达水平的影响 [J]. 水产学报, 2020, **44**(5): 707-714.]
- [40] Yuan J, Wang Z, Wang B, *et al.* Non-specific immunity

- associated gut microbiome in *Aristichthys nobilis* under different rearing strategies [J]. *Genes*, 2021, **12**(6): 916.
- [41] Saurabh S, Sahoo P K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system [J]. *Aquaculture Research*, 2008, **39**(3): 223-239.
- [42] Zang X L. The immune response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in three environmental factors [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010: 5. [臧学磊. 三种环境因子胁迫对罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 5.]
- [43] Li X, Liu L, Zhang Y, *et al.* Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Chemosphere*, 2013, **93**(2): 428-433.
- [44] Shan N, Lin T T, Lai Q F, *et al.* Effects of four environmental stresses on biochemical indexes in the plasma of gibel carp *Carassius auratus gibelio* [J]. *Marine Fisheries*, 2017, **39**(2): 162-172. [单娜, 林听听, 来琦芳, 等. 4种环境源性胁迫对异育银鲫血浆生化指标的影响 [J]. *海洋渔业*, 2017, **39**(2): 162-172.]
- [45] Zhao J, Gu Z L, Cui Q M, *et al.* Effects of “Kebaike” on the activities of succinate dehydrogenase, phosphotriglyceride and glutamic oxalacetic transaminase in *Penaues chinensis* [J]. *China Feed*, 2002(3): 31-32. [赵杰, 谷子林, 崔青曼, 等. “克白克”对中国对虾体内琥珀酸脱氢酶、磷酸甘油三酯和谷草转氨酶活性的影响 [J]. *中国饲料*, 2002(3): 31-32.]
- [46] Xu Y. Physiological response to stress of ammonia and nitrite in tilapia, *Oreochromis niloticus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 6-7. [徐杨. 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)对氨氮和亚硝酸盐胁迫的生理响应 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 6-7.]
- [47] Wang A R, Ran C, Ring E, *et al.* Progress in fish gastrointestinal microbiota research [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, **10**(3): 626-640.
- [48] Dulski T, Kozłowski K, Ciesielski S. Habitat and seasonality shape the structure of tench (*Tinca tinca* L.) gut microbiome [J]. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1): 1-11.
- [49] Qi X Z. Effects of ammonia nitrogen stress on immune system and intestinal microbiota of *Carassius auratus* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017: 38-40. [戚晓舟. 氨氮胁迫对鲫免疫系统及肠道菌群结构的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017: 38-40.]
- [50] Khan I, Huang Z, Liang L, *et al.* Ammonia stress influences intestinal histomorphology, immune status and microbiota of Chinese striped-neck turtle (*Mauremys sinensis*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021(222): 112471.
- [51] Hassenrück C, Reinwald H, Kunzmann A, *et al.* Effects of thermal stress on the gut microbiome of juvenile milkfish (*Chanos chanos*) [J]. *Microorganisms*, 2020, **9**(1): 5.
- [52] Ramírez C, Coronado J, Silva A, *et al.* Cetobacterium is a major component of the microbiome of giant Amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador [J]. *Animals*, 2018, **8**(11): 189.
- [53] Llewellyn M S, McGinnity P, Dionne M, *et al.* The biogeography of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome [J]. *The ISME Journal*, 2016, **10**(5): 1280-1284.
- [54] Egerton S, Wan A, Murphy K, *et al.* Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate [J]. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1): 1-16.
- [55] Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, **9**(4): 279-290.
- [56] Bradlow H L. Obesity and the gut microbiome: pathophysiological aspects [J]. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2014, **17**(1): 53-61.
- [57] Izaguirre-Anariba D E, Sivapalan V. *Chryseobacterium indologenes*, an emerging bacteria: a case report and review of literature [J]. *Cureus*, 2020, **12**(1): e6720.
- [58] Wang X Y, Han Y N, Jin S, *et al.* Identification and analysis on extracellular products characteristics of *Chryseobacterium indologenes* isolation from *Channa argus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(3): 641-646. [王鑫毅, 韩艳楠, 金珊, 等. 乌鳢产吡啶金黄杆菌的鉴定及其胞外产物特性分析 [J]. *水生生物学报*, 2016, **40**(3): 641-646.]
- [59] Malick R C, Bera A K, Chowdhury H, *et al.* Identification and pathogenicity study of emerging fish pathogens *Acinetobacter junii* and *Acinetobacter pittii* recovered from a disease outbreak in *Labeo catla* (Hamilton, 1822) and *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) of freshwater wetland in West Bengal, India [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **51**(6): 2410-2420.
- [60] Cao S, Geng Y, Yu Z, *et al.* *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax* genus in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, **65**(6): 1816-1822.
- [61] Li J, Cao J, Wang X, *et al.* *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, **101**(16): 6459-6471.
- [62] Santos J A, Rodríguez-Calleja J M, Otero A, *et al.* *Plesiomonas* [M]. Molecular Medical Microbiology. Academic Press, 2015: 1111-1123.
- [63] Pękala-Safińska A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish [J]. *Journal of Veterinary Research*, 2018, **62**(3): 261.

- [64] Li J B, Han F, Yu W G. Model systems for bacterial biofilm research [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 558-561. [李京宝, 韩峰, 于文功. 细菌生物膜研究技术 [J]. *微生物学报*, 2007, 47(3): 558-561.]
- [65] Xu Y, Dhaouadi Y, Stoodley P, *et al.* Sensing the unreachable: challenges and opportunities in biofilm detection [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020(64): 79-84.

AMMONIA-N STRESS ON TISSUE STRUCTURE, ENZYME ACTIVITY AND INTESTINAL MICROBIOTA OF *MACROPTERUS SALMOIDES*

WEI Meng-Shen¹, ZHENG Tao^{1,2}, LU Si-Qi², QIANG Jun^{1,2}, TAO Yi-Fan², LI Yan² and XU Pao^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Ammonia-N is one of the main pollutants in intensive culture environment and can cause serious oxidative stress and immune damage to aquatic organisms. Liver and intestinal are important defense mechanisms to protect organisms from biotic and abiotic stresses, however, the response mechanism of liver and intestine to ammonia stress in *Macropterus salmoides* remains unclear. We investigated the response mechanism of liver and gut to ammonia nitrogen stress in juvenile *Macropterus salmoides*, three concentrations of 0, 25 and 50 mg/L (Non-ionic ammonia concentrations of 0, 0.55 and 1.11 mg/L) were set for larval *Macropterus salmoides* (15.32±0.65) g in order to study the effects of ammonia-N stress for 48h on liver and intestinal tissue structure, enzyme activities and intestinal microorganisms of *Macropterus salmoides*. The results showed that after 48h of ammonia stress, both 25 and 50 mg/L ammonia-N stress caused hepatocyte vacuolization and hepatocyte arrangement disorder in liver tissue. In addition, 50 mg/L ammonia-N stress increased the number of goblet cells in intestinal tract, villus width and muscle layer thickness. The activities of GPT and GOT in liver tissue of 25 and 50 mg/L groups were significantly decreased compared with the control group. The LZM activity in liver tissue, SOD activity, CAT activity and MDA content in intestinal tissue were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The activity of complement C3 in 50 mg/L group was observably higher than that in the control group ($P<0.05$). Ammonium-nitrogen stress affected Alpha and Beta diversity significantly. At the phylum level, the relative abundance of Bacteroidetes and spirochetes in 50 mg/L group was significantly increased compared with the control group ($P<0.05$). At the genus level, the abundance of *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* and *Brevinema* in the 50 mg/L group was remarkably higher than that in the control group, while the abundance of *Plesiomonas* was significantly decreased ($P<0.05$). The results of BugBase phenotype prediction showed that Gram-negative bacteria were absolutely dominant in the intestinal flora. Moreover, intestinal flora in 50 mg/L group had lower biofilm formation ability and stress tolerance. This study showed that ammonia nitrogen stress caused damage to the liver and intestinal tissues of *Macropterus salmoides*, and decreased the metabolism and detoxification ability of the fish. The activity of antioxidant enzymes increased, and the *Macropterus salmoides* developed oxidative stress. The activities of lysozyme and complement C3 rised, GOP and GPT activities decreased, and the ability of non-specific immune system decreased at the same time, the composition of intestinal flora is changed, the stress tolerance of intestinal flora is reduced, and the intestinal function is easily damaged. This study will provide a theoretical basis for analyzing the harm of ammonia-N to fish.

Key words: Ammonia-N stress; Antioxidant; Immune; Intestinal Microbiome; *Macropterus salmoides*