



甘露寡糖对低盐胁迫下凡纳滨对虾生长、健康及肠道菌群的影响

汤上上¹, 韩凤禄^{1*}, 周利¹, 刘世誉¹,
徐畅¹, 陈立侨², 李二超^{1*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省水产种业工程研究中心, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海口 570228;
2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要: 为研究低盐胁迫(盐度 3)下, 饲料添加不同含量的甘露寡糖(mannan oligosaccharide, MOS)对凡纳滨对虾生长性能、抗氧化能力、免疫力和肠道微生物的影响。低盐条件下, 给实验组对虾(0.68 ± 0.01)g 分别饲喂含有 2、4 和 8 g/kg MOS 的实验饲料, 并将在盐度 25 和 3 条件下饲喂 0 g/kg MOS 饲料的对虾作为海水对照组和低盐对照组, 养殖周期 42 d。结果显示: ① 相比于低盐对照组, 海水对照组、4 和 8 g/kg MOS 组对虾生长性能显著升高。② 与海水对照组相比, 低盐条件下各处理组对虾肝胰腺总超氧化物歧化酶、谷胱甘肽硫基转移酶活力显著降低($P < 0.05$), 仅低盐对照组和 2 g/kg MOS 组丙二醛含量显著升高。③ α 多样性分析显示, 4 和 8 g/kg MOS 组对虾肠道菌群丰富度(ACE, chao1)指数显著升高。另外, β 多样性分析显示, 海水对照组对虾肠道微生物与低盐条件下的各组都发生了明显分离。④ 相比于两个盐度对照组, 2 和 4 g/kg MOS 组对虾肠道变形菌门相对丰度显著降低, 厚壁菌门和疣微菌门相对丰度显著上升。⑤ L3 水平的功能预测结果显示, 低盐胁迫对肠道微生物介导的功能影响较弱, 而 4 g/kg MOS 显著提高了对虾肠道微生物介导的大多数与代谢和免疫相关通路的表达量。研究表明, 饲料添加 MOS 能提高低盐胁迫下凡纳滨对虾的生长性能、抗氧化能力和免疫力, 并通过调节肠道微生物组成和结构提高对虾应对低盐环境的能力, 实现低盐条件下凡纳滨对虾健康养殖的饲料 MOS 最适添加量为 4 g/kg。

关键词: 凡纳滨对虾; 低盐; 甘露寡糖; 生长; 抗氧化; 肠道菌群

中图分类号: S 963

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)以其适宜盐度范围广、生长速度快和肉质鲜美等特点成为世界上养殖范围最广的虾种。为了满足全球对海产品日益增长的需求, 同时避免水质恶化和新病害的出现, 多地已经开展了低盐度水域

的对虾养殖^[1-2]。尽管对虾能在极低盐度环境(盐度 0.5)中存活^[3], 但是长期低盐度养殖仍会造成多种不良反应, 如生长性能下降^[4]、存活率降低^[5]、产生氧化应激^[6]、免疫应答受损^[7]和肠道菌群失调^[8]等。因此, 有必要寻找安全有效的方

收稿日期: 2021-03-19 修回日期: 2021-05-29

资助项目: 广东省重点领域研发计划(2020B0202010001); 国家自然科学基金(32060832);

国家重点研发计划(2018YFD0900400); 海南大学科研启动基金[KYQD(ZR)1736]

第一作者: 汤上上(照片), 从事水产养殖研究, E-mail: 1079186778@qq.com

通信作者: 韩凤禄, E-mail: hanfenglu@163.com; 李二超, E-mail: ecl@bio.ecnu.edu.cn



法来缓解这些不良反应。

饲料营养调控动物生理状态已经被证明是一个可行的方法。如在饲料中添加甘露寡糖、菊粉、 β -葡聚糖、低聚果糖和酵母提取物等益生元, 被证明能够提高水生动物的生长性能和免疫力, 已在水生生物中得到了广泛应用^[9-14]。在众多益生元中, 甘露寡糖 (MOS) 是鱼类和甲壳类常用的饲料添加剂。甘露寡糖是一种面包酵母细胞壁的提取物, 能通过刺激机体分泌消化酶、增强抗氧化能力、免疫力和抗逆性提高水生动物的生长性能并改善其健康状态^[15-16]。在鱼类的低盐胁迫实验中发现, 饲料中添加 2 g/kg MOS 能显著改善军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼肠道形态并提高其存活率^[17]; 1.5~2.0 g/kg MOS 可提高真鲷 (*Pagrus major*) 幼鱼的生长性能及血清和黏液的免疫力^[16], 这些结果表明在饲料中添加适量的 MOS 能够改善低盐胁迫对鱼类健康造成的负面效应。此外, 在对甲壳类生物的相关研究中发现, 4.0~6.0 g/kg MOS 能提高波纹龙虾 (*Panulirus homarus*) 的生长性能、存活率并改善肠道菌群^[18]; 2.0~4.0 g/kg MOS 能显著提高凡纳滨对虾的生长性能, 增加肠道微绒毛长度, 提高其应对氨氮胁迫的能力^[19]。上述关于甲壳类生物的研究都在海水条件下 (盐度 30~32) 进行, 而饲料中补充 MOS 能否提高海洋虾蟹类适应低盐养殖环境的研究却鲜有报道。

本实验探究了低盐条件 (盐度为 3) 下, 饲料中添加不同含量 MOS 对凡纳滨对虾生长性能、抗氧化能力、免疫力和肠道菌群的影响, 以期对凡纳滨对虾在低盐条件下的健康养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验配方基于本实验室前期相关研究基础^[11], 配制了以鱼粉和豆粕作为蛋白源, 鱼油、豆油、胆固醇和卵磷脂为脂肪源, 小麦淀粉为糖源的 4 组等氮等能、粗蛋白含量约为 35%、粗脂肪含量约为 9% 的基础饲料, 饲料配方见表 1。饲料原料经粉碎过 60 目筛, 逐级混合均匀后, 通过双螺杆挤条机 (F-26, 广东华工光电科技有限公司, 广东, 中国) 挤压成条, 破碎后过筛制成粒径为 2 mm 颗粒饲料, 室温风干后放入密封袋中, 置于 -20 °C 冰柜中保存备用。

表 1 凡纳滨对虾 4 种实验饲料实验饲料的配方

Tab. 1 Ingredient formulation of the four experimental diets fed to *L. vannamei*

原料 ingredients	甘露寡糖含量/(g/kg) MOS concentration			
	0	2	4	8
鱼粉 fish meal	370.0	370.0	370.0	370.0
豆粕 soybean meal	280.0	280.0	280.0	280.0
小麦粉 wheat starch	200.0	200.0	200.0	200.0
鱼油 fish oil	22.8	22.8	22.8	22.8
豆油 soybean oil	25.0	25.0	25.0	25.0
卵磷脂 lecithin	10.0	10.0	10.0	10.0
胆固醇 cholesterol	5.0	5.0	5.0	5.0
复合维生素 vitamin premix ¹⁾	20.0	20.0	20.0	20.0
复合矿物质 mineral premix ²⁾	5.0	5.0	5.0	5.0
维生素C vitamin C	1.0	1.0	1.0	1.0
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethyl cellulose	30.0	30.0	30.0	30.0
纤维素 cellulose	11.2	9.2	7.2	3.2
碳酸钙 calcium carbonate	20.0	20.0	20.0	20.0
甘露寡糖 MOS ³⁾	0.0	2	4	8
总计 total	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

注: 1) 维生素预混料提供下列维生素(g/kg预混料): 盐酸硫胺 0.5; 核黄素 3.0; 盐酸吡哆醇 1.0; DL-calcium泛酸盐 5.0; 烟酸 5.0; 生物素 0.05; 叶酸 0.18; 维生素B12 0.002; 氯化胆碱 100.0; 肌醇 5.0; 甲萘醌 2.0; 醋酸维生素A(20 000 IU/g) 5.0; 维生素D3(400 000 IU/g) 0.002; dl-alpha-生育酚乙酸酯(250 IU/g) 8; α -纤维素 865.266; 2) 微量矿物预混料提供以下矿物质[g/(100 g)预混料]: 氯化钴 0.004; 五水硫酸铜 0.250; 硫酸亚铁 4.0; 七水硫酸镁 28.398; 一水硫酸锰 0.650; 碘化钾 0.067; 亚硒酸钠 0.010; 七水硫酸锌 13.193; 磷酸二氢钠 15; 填料 38.428。3) MOS 购自中国广州亿莱宝生物科技有限公司, 原料来源于酵母细胞壁

Notes: 1) Vitamin premix, provided the following vitamins (g/kg premix): thiamin HCl 0.5; riboflavin 3.0; pyridoxine HCl 1.0; DL-calcium pantothenate 5.0; nicotinic acid 5.0; biotin 0.05; folic acid 0.18; vitamin B12 0.002; choline chloride 100.0; inositol 5.0; menadione 2.0; vitamin A acetate(20 000 IU/g) 5.0; vitamin D3 (400 000 IU/g) 0.002; DL-alpha-tocopheryl acetate (250 IU/g) 8; α -cellulose 865.266.2) Trace mineral premix provided the following minerals [g/(100 g) premix]: cobalt chloride 0.004; cupric sulphate pentahydrate 0.250; ferrous sulphate 4.0; magnesium sulphate heptahydrate 28.398; manganese sulphate monohydrate 0.650; potassium iodide 0.067; sodium selenite 0.010; zinc sulphate heptahydrate 13.193; sodium dihydrogen phosphate 15; filler 38.428.3) MOS was extracted from the yeast cell wall and purchased from Guangzhou Yilaibao Biotechnology Co., LTD

1.2 养殖管理

凡纳滨对虾实验用虾苗由海南文昌蓝色海洋有限公司提供。在正式实验开始前, 幼虾在 600 L 塑料桶 (盐度 25) 内暂养 7 d, 然后将部分虾苗分

出, 暂养于另一 600 L 塑料桶内, 逐步淡化培养, 直至水体盐度降至 3。驯养结束后, 从两暂养桶内分别挑选活泼健康、规格一致的凡纳滨对虾 (0.68 ± 0.01) g, 分成 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 20 尾虾, 按养殖环境盐度和 MOS 添加含量分为: ① 海水对照组 (盐度 25 + 0 g/kg MOS 饲料); ② 低盐对照组 (盐度 3 + 0 g/kg MOS 饲料); ③ 盐度 3 + 2 g/kg MOS 饲料; ④ 盐度 3 + 4 g/kg MOS 饲料; ⑤ 盐度 3 + 8 g/kg MOS 饲料。实验虾放入玻璃缸 (60.0 cm × 30.0 cm × 36.0 cm) 内, 玻璃缸在空间位置上均匀排布, 以减小各组因光线等因素造成的误差。实验期间, 保持饱食投喂, 每天投喂 4 次 (08:00、12:30、18:30 和 23:00), 根据摄食情况适当调整投喂量。养殖实验持续 42 d, 养殖期间日换水量 50%, 进水经 200 目滤水袋过滤。养殖期间保持连续充气, 水体溶解氧量控制在 6.0 mg/L 以上。

1.3 样品采集及处理

42 d 养殖实验后, 饥饿 24 h 取样。记录每个重复中对虾的数量, 测量每尾虾的体长和体质量, 用来计算存活率、增重率、特定生长率和肥满度。每个重复采集 6 尾对虾的肝胰腺并称重, 用来计算肝体指数。每个重复随机挑选 2 尾虾, 保存于 -20 °C 的冰箱中, 用于全虾体成分分析。每个重复另取 1 尾对虾, 用 1.0 mL 针管从腹窦抽取血淋巴, 与抗凝剂 (450 mmol/L NaCl, 100 mmol/L KCl, 100 mmol/L HEPES, 100 mmol/L EDTA-Na₂, pH=7.3) 混合均匀 (1:1) 后储存于 1.5 mL 离心管, 用于免疫指标的测定。在托盘上快速解剖对虾, 将肝胰腺、肠道、鳃和肌肉组织放入无菌冻存管中, 每个处理组随机选择 4 个肠道样本进行肠道微生物分析。所有样品采集后立即保存在液氮中, 随后转移至 -80 °C 冰箱, 用于进一步的生化和酶活性指标分析。

1.4 测定指标和方法

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $100 \times (\text{最终重量} - \text{初始重量}) / \text{初始重量}$;

特定生长率 (specific growth rate, SGR, %/d) = $100 \times (\ln \text{最终重量} - \ln \text{初始重量}) / \text{实验天数}$;

肥满度 (condition factor, CF) = $100 \times \text{体质量} / \text{体长}^3$;

肝体指数 (hepatosomatic index, HSI, %) = $100 \times$

肝胰腺重/体质量;

存活率 (survival rate, SR, %) = $100 \times \text{最终虾数量} / \text{初始虾数量}$ 。

1.5 全虾体组成分析

全虾及饲料组成分析参考 AOAC(2000) 的标准方法进行分析。在 105 °C 条件下, 全虾烘干至恒重后计算水分含量。采用杜马斯燃烧法 (Dumas RAPID N EXCEED) 和索氏抽提法分别计算测定粗蛋白和粗脂肪含量, 并在马弗炉中以 550 °C 的温度焚烧样品测定灰分含量。

1.6 抗氧化指标和免疫指标的测定

肝胰腺样品解冻后, 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下, 制备成 10% 的组织匀浆, 离心 (2500 r/min, 10 min), 取上清, 用于抗氧化指标的测定: 总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD, 比色法)、过氧化氢酶 (catalase, CAT, 钼酸铵法)、谷胱甘肽硫基转移酶 (glutathione S-transferase, GST, 比色法)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA, 比色法)。样品准备好后, 测定蛋白质浓度 (total protein, TP, 考马斯亮蓝法)。测定所用试剂盒购自于南京建成生物工程研究所, 具体实验操作按试剂盒说明书进行。

1.7 血蓝蛋白浓度和呼吸爆发活性检测

参考 Yang 等^[20]的方法, 将 30 μL 的血淋巴-抗凝置于 96 孔板上, 加入 270 μL 的双蒸水。使用 Microplate Reader (Epoch, BioTek, USA) 测量 335 nm 处的光密度, 计算血蓝蛋白浓度 (hemocyanin content, Hc): $E_{335 \text{ nm}} (\text{mg/mL}) = 2.3 \times \text{OD}_{335 \text{ nm}}$ 。

采用氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原 formazan 作为产生超氧阴离子的指标^[21-22]。将 100 μL 血淋巴-抗凝置于 1.5 mL 离心管中, 800×g, 4 °C, 离心 20 min。弃上清液, 加入 100 μL 改良完全汉克平衡盐溶液 (MCHBSS) (0.3% zymosan), 室温反应 30 min。加入 100 μL NBT (0.3%) 溶液, 室温孵育 30 min, 再加入 100 μL 100% 甲醇停止反应, 待反应结束弃混合物。用 100 μL 70% 甲醇洗涤三次, 风干 30 min, 加入 120 μL 2 mol/L 氢氧化钾 (KOH) 和 140 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解 NBT 还原形成的不溶性 formazan 晶体测量每个样品

的 $OD_{630\text{ nm}}$ 并计算呼吸爆发活性 (respiratory burst activity, RBs)。

1.8 肠道微生物分析

肠道微生物测序由诺禾致源科技股份有限公司(中国, 北京)协助完成。细菌 DNA 提取后采用正向引物 515F (5'GTGCCAGCMG25PSUGCGGTAA 3') 和反向引物 806R (5'GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3'), PCR 扩增细菌 16S 核糖体 RNA 基因的 V3-V4 区。测序文库使用 Illumina 公司 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒构建, 文库合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序, 生成单端 reads。本文获得的序列可以在 SRA 中获得, 其登录号为 PRJNA693825。使用 QIIME 对原始序列数据进行过滤。质量控制后, 利用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://www.drive5.com/uparse/>)^[23] 对所有样本进行聚类, 以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs, 同时选取 OTUs 的代表性序列。对 OTUs 序列进行物种注释, 用 Mothur 方法与 SILVA138 (<http://www.arb-silva.de/>)^[24] 的 SSUrRNA 数据库^[25] 进行物种注释分析 (设定阈值为 0.8~1.0)。利用 QIIME (Version 1.9.1) 软件^[26] 计算 Alpha 多样性指数 (ACE、Chao1、Simpson、Shannon) 和 NMDS, 并用 Venn 图分别识别共享与唯一的 OTUs。应用线性判别分析 (LDA) 效应大小 (LEfSe) 鉴定各实验组具有统计学意义的 biomarker (LDA>3.5)。此外, 为了定量比较 5 组对虾肠道菌群 (丰度在前 50 位) 种间相互作用的差异, 选取符合标准的连接 ($Rho > 0.6, P < 0.01$) 作为有效连接构建种间相互作用网络图并计算其组拓扑特性, 包括平均度、模块化和合作/竞争相互关系。使用 Tax4Fun 对 OTUs 进行功能预测^[27]。

1.9 数据处理和分析

实验数据用平均值±标准误 (mean ± SE) 表示, 采用 SPSS 22.0 分析软件, 海水对照组与低盐处理下的各组进行独立样本 *t* 检验; 低盐养殖条件下的各实验组进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并作 Duncan 氏多重比较检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。利用 SPSS 22.0 分析软件进行 Spearman 相关性分析, 对代表微生物属、先天免疫、粗蛋白和粗脂肪含量进行相关性分析。使用 Gephi 和 Cytoscape 3.1.1 软件

对网络图进行计算和可视化处理。

2 结果

2.1 生长性能

不同水体盐度与饲料 MOS 含量条件下, 海水对照组对虾增重率和特定生长率极显著高于低盐对照组 ($P < 0.01$), 与 MOS 添加组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。低盐条件下, 随着饲料中 MOS 含量的增加, 各组增重率、特定生长率和肥满度呈上升趋势。相比于低盐对照组, 8 g/kg MOS 组增重率、特定生长率和肥满度显著升高 ($P < 0.05$), 而 4 g/kg MOS 组仅特定生长率显著升高 ($P < 0.05$)。各处理组间肝体指数和存活率均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

2.2 全虾体成分

各组凡纳滨对虾全虾灰分和水分含量没有显著差异 ($P > 0.05$)。3 个 MOS 添加组对虾粗脂肪含量显著高于 2 个盐度对照组 ($P < 0.05$)。此外, 8 g/kg MOS 组对虾粗蛋白含量显著低于 2 个盐度对照组 ($P < 0.05$), 2 g/kg MOS 组对虾粗蛋白含量显著低于海水对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.3 抗氧化性能和免疫指标

不同水体盐度与饲料 MOS 含量条件下, 与海水对照组相比, 低盐条件下各处理组总超氧化物歧化酶和谷胱甘肽硫基转移酶活性显著降低 ($P < 0.05$), 低盐对照组和 2 g/kg MOS 组丙二醛含量显著升高 ($P < 0.05$), 而 4 和 8 g/kg MOS 组丙二醛含量恢复到海水对照组水平 ($P > 0.05$), 并显著低于低盐对照组和 2 g/kg MOS 组 ($P < 0.05$)。

海水对照组中血蓝蛋白浓度和呼吸爆发活性显著高于低盐对照组 ($P < 0.05$)。低盐胁迫条件下, 各处理组血蓝蛋白浓度无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 MOS 组对虾呼吸爆发活性都显著高于低盐对照组 ($P < 0.05$)。随着饲料中 MOS 含量的升高, 血蓝蛋白浓度和呼吸爆发活性都呈上升趋势, 其中, 8 g/kg MOS 组呼吸爆发活性显著高于 2 g/kg MOS 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.4 肠道微生物结构、组成和多样性

实验肠道样品共获得 1 658 473 条高质量有效测序 reads, 平均每个样本得到 87 288 条序列, 序列平均长度为 415.89 bp。纵观所有样本结果

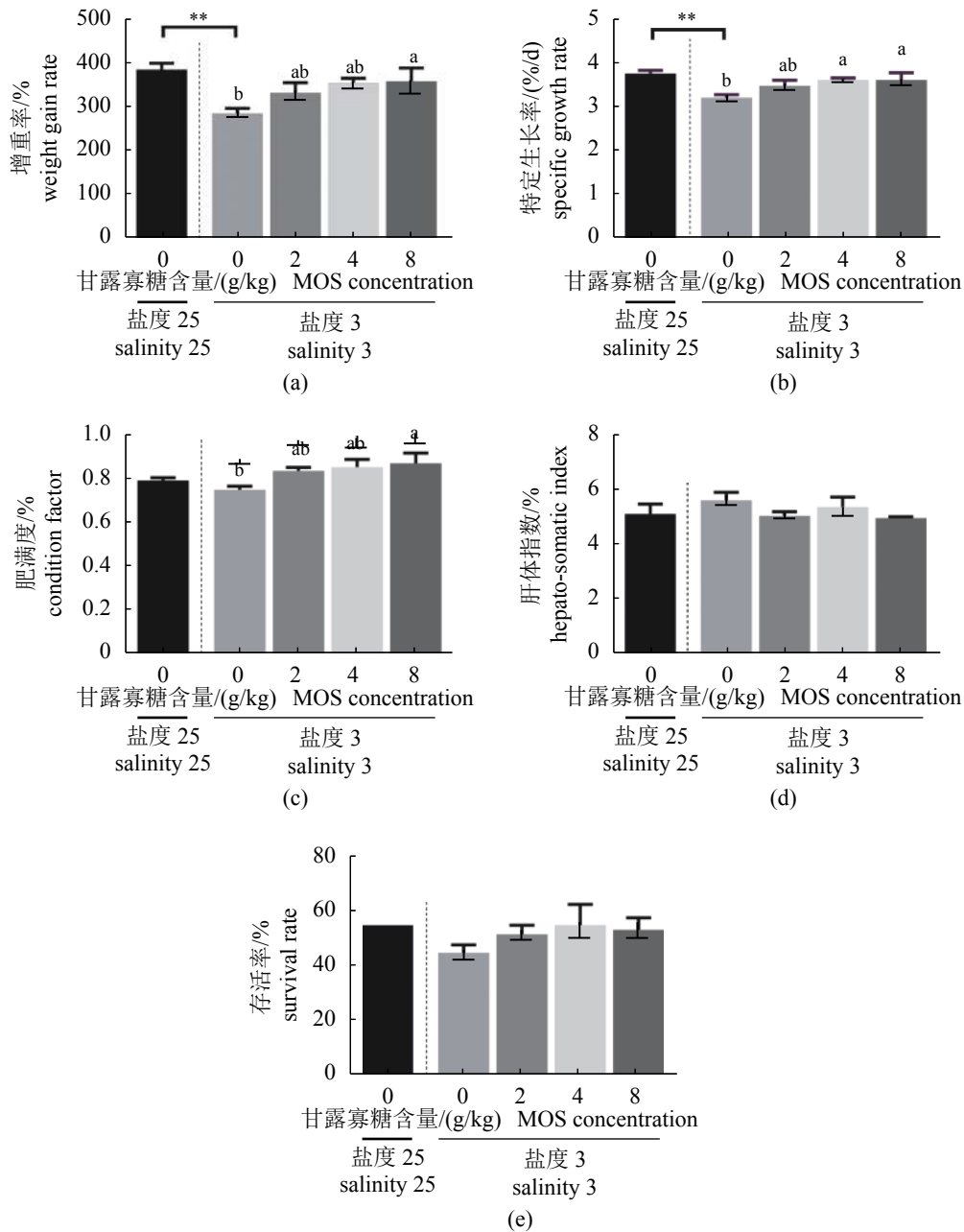


图 1 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾生长性能的影响。

*表示表示组间差异显著 ($P < 0.05$), **表示组间差异极显著 ($P < 0.01$); 标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 1 Effects of different water salinity and dietary MOS concentration on growth performance of *L. vannamei*.

Values with * represents significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference between groups ($P < 0.01$); Different small letters represent significant difference ($P < 0.05$), and same small letters represent no significant difference among groups ($P > 0.05$)

发现, 门水平下凡纳滨对虾肠道中优势菌群依次是变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacteriota) 和厚壁菌门 (Firmicutes)(图 3-b)。2 种盐度对照组优势门 (top 10) 中仅低盐对照组疣微菌门 (Verrucomicrobiota) 相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。相比于海水对照组, MOS 添加组变形菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.05$),

而厚壁菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 2 和 8 g/kg MOS 组浮霉菌门相对丰度也显著升高 (图 3-c)。相比于低盐对照组, 2 和 4 g/kg MOS 组变形菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.05$), 厚壁菌门和疣微菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)。

另外, α 多样性分析显示, 2 种盐度对照组肠道菌群物种多样性 (Shannon, Simpson) 和丰富

表 2 各组凡纳滨对虾饲喂实验饲料的体成分分析(比干重, %)

Tab. 2 Whole body composition of *L. vannamei* fed experimental diets at different water salinity (dry weight basis, %)

	盐度25 salinity 25		盐度3 salinity 3		
	甘露寡糖含量/(g/kg) MOS concentration		甘露寡糖含量/(g/kg) MOS concentration		
	0	0	2	4	8
粗蛋白 crude protein	74.13 ± 1.21	71.99 ± 1.35 ^a	68.15 ± 1.30 ^{**ab}	70.37 ± 1.93 ^{ab}	67.45 ± 2.17 ^{ab}
粗脂肪 crude lipid	8.23 ± 0.36	8.33 ± 1.34 ^b	13.00 ± 0.60 ^{**a}	13.01 ± 0.65 ^{**a}	11.27 ± 1.41 ^{*a}
灰分 ash	13.82 ± 0.52	14.73 ± 1.18	11.02 ± 3.01	12.32 ± 1.28	13.49 ± 1.25
水分 moisture	77.64 ± 0.87	78.06 ± 1.79	76.49 ± 0.56	79.36 ± 1.37	77.24 ± 0.51

注: 同行数据肩标*表示表示组间差异显著($P < 0.05$), **表示组间差异极显著($P < 0.01$); 标有不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)

Notes: In the same row, values with * represents significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference between groups ($P < 0.01$) and different small letters represent significant difference among groups ($P < 0.05$)

度(ACE, Chao1)无显著差异($P > 0.05$)。在低盐胁迫条件下, 肠道微生物物种多样性和丰富度指数随着MOS添加量的增加而增加, 并在4 g/kg MOS组中达到最大, 而后下降。相比于2种盐度对照组, 4和8 g/kg MOS组ACE和chao1指数显著升高($P < 0.05$)。此外, 4 g/kg MOS组ACE和chao1指数显著高于2 g/kg MOS组($P < 0.05$)。同样地, 2 g/kg MOS也提高了肠道微生物 α 多样性指数, 但仅在ACE指数上表现出显著性($P < 0.05$)(图4)。Venn图显示, 所有样品核心OTUs有274个, 各组特有OTUs分别有237、161、58、338和123个(图3-d)。NMDS图显示, 海水对照组与低盐胁迫条件下的各组(0, 2, 4, 8 g/kg MOS)都发生了明显分离, 并获得了Anosim分析结果的支持(P 值分别为0.028, 0.028, 0.020, 0.042)(图3-a)。

2.5 相关性分析

为了进一步阐明改变后的微生物群落对先天免疫、粗蛋白和粗脂肪的影响, 本研究采用Spearman相关分析检验肠道微生物、先天免疫、粗蛋白和粗脂肪之间的相关性。微生物类群(在属水平上)仅限于组间具有统计学差异的Biomarker(LDA>3.5)。微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、巨大芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)以及粗脂肪含量和粗蛋白含量呈显著负相关; 拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Agathobacter*、布劳特氏菌属(*Blautia*)、艾克曼菌属(*Akkermansia*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)相对丰度与凡纳滨对虾呼吸爆发活性和粗脂肪含量呈显著正相关(图5)。

2.6 肠道微生物种间相互关系

为了评估低盐胁迫和饲料添加MOS对肠道菌群间相互作用的影响, 建立了菌群互作网络图。海水对照组对虾共现网络图由43个节点和167条边组成, 明显高于低盐对照组对虾共现网络图(35个节点和78条边)(表3)。共现图显示, 海水对照组网络图比低盐对照组网络图更复杂, 密度更高(图6, 表3)。在低盐条件下, 饲料添加MOS明显提高了对虾共现网络图的规模(分别为45、40、46个节点, 360、159和118条边), 随着饲料MOS浓度的升高, 各组网络图的复杂程度和密度都呈现先升高后降低趋势, 并在2 g/kg MOS组达到最大值。此外, 低盐对照组和8 g/kg MOS组对虾的正相互关系率更高(表3), 表明肠道菌群中有更高层次的合作活动。

2.7 肠道功能预测

利用Tax4Fun预测肠道菌群的功能。结果显示, 环境信息处理、遗传信息处理、代谢和细胞过程是所有样本的4个主要预测功能。在L3水平, 与海水对照组相比, 低盐对照组在能量代谢途径(光合生物的固碳作用)和排泄系统(醛固酮调节的钠重吸收、内分泌和其他因子调节钙重吸收)通路表达量显著降低($P < 0.05$), 而4 g/kg MOS组在与能量代谢相关的通路, 如糖酵解/糖异生、淀粉和蔗糖代谢、光合生物的固碳作用、光合作用、肽酶、矿物质吸收、蛋白质消化和吸收、碳水化合物的消化和吸收的代谢, 表达量显著高于海水对照组($P < 0.05$)。除了Fc γ R

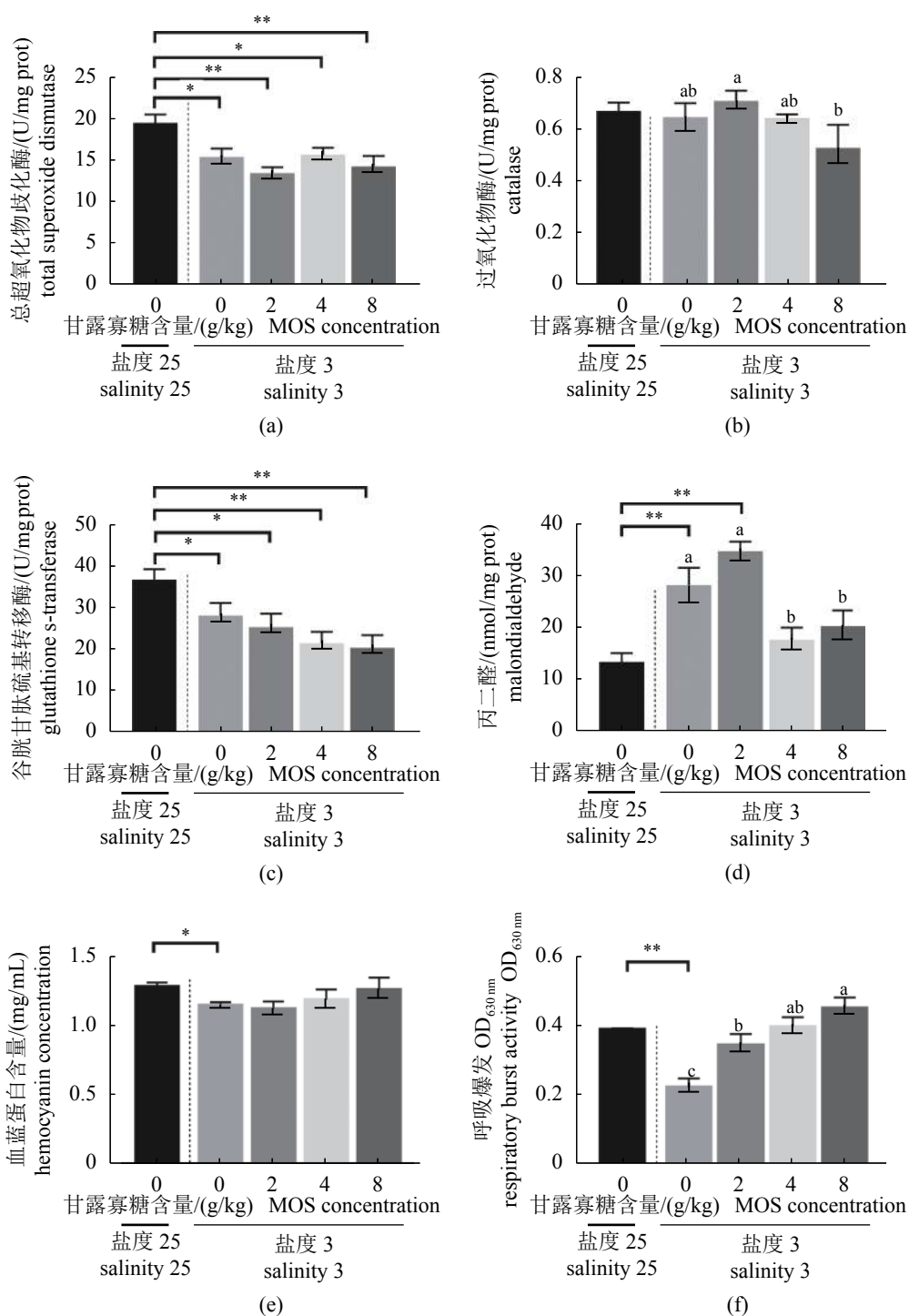


图2 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾抗氧化酶活力和免疫指标的影响

*表示表示组间差异显著 ($P < 0.05$), **表示组间差异极显著 ($P < 0.01$); 标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$), 下同

Fig. 2 Effects of different water salinity and dietary MOS concentration on antioxidant enzymes activities and immune parameters of *L. vannamei*

Values with * represent significant difference between groups ($P < 0.05$), **represents extremely significant difference between groups ($P < 0.01$); Different small letters represent significant difference ($P < 0.05$), and same small letters represent no significant difference among groups ($P > 0.05$). The same as below

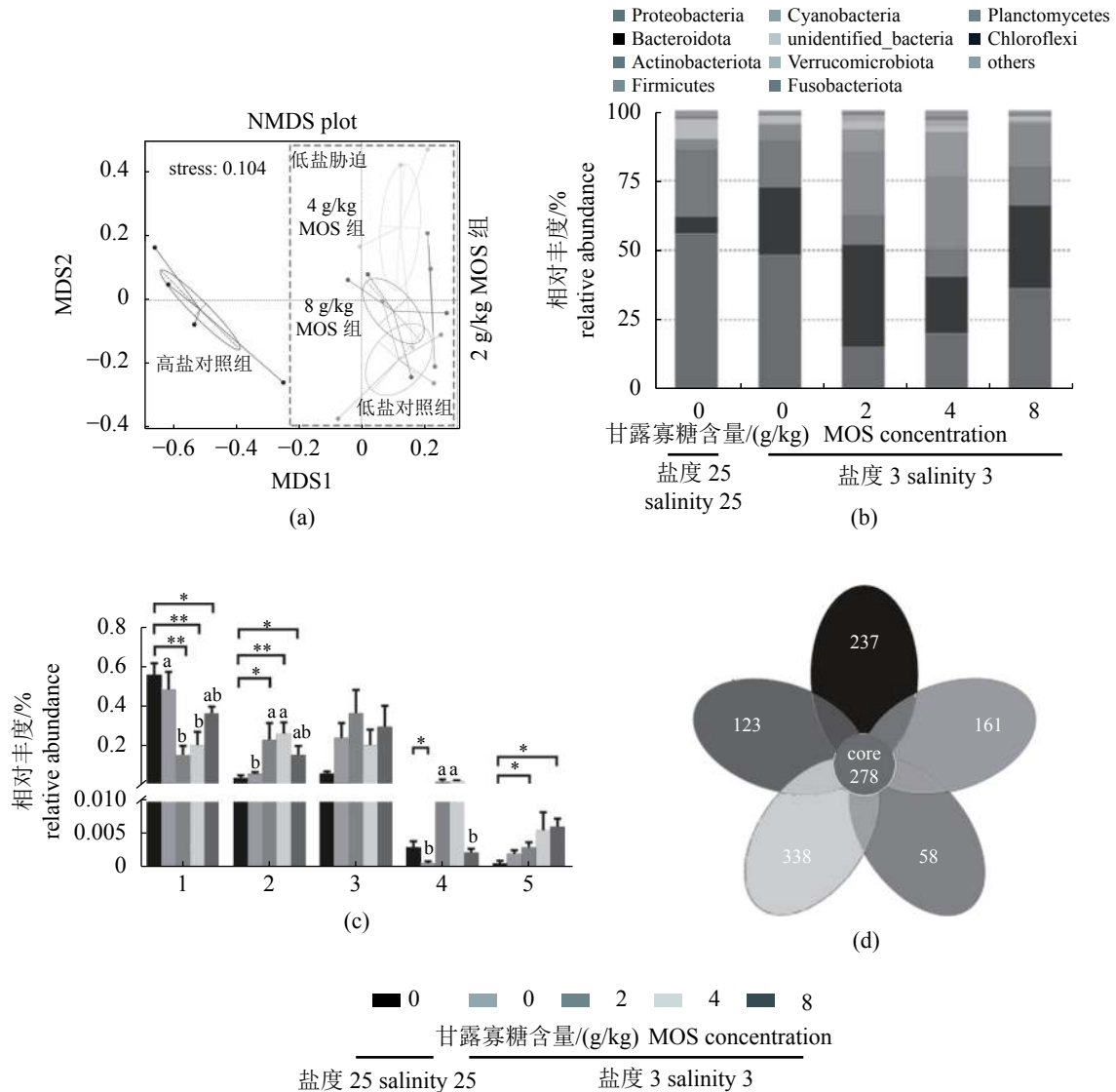


图 3 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾肠道群落组成、结构及 Venn 图的影响

(a) β 多样性分析, NMDS; (b) 门水平微生物组成 (前 10); (c) 在门水平上相对丰度具有差异的细菌, 1. 变形门, 2. 厚壁菌门, 3. 拟杆菌门, 4. 疣微菌门, 5. 浮霉菌门。(d) 韦恩图, 各组特有的和共有的 OTUs。*表示表示组间差异显著 ($P < 0.05$), **表示组间差异极显著 ($P < 0.01$); 标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$), 下同

Fig. 3 Effects of different water salinity and dietary MOS concentration on intestinal bacterial community composition, structure and Venn diagram of *L. vannamei*

(a) Beta diversity analysis NMDS; (b) Relative abundance of bacteria at the phylum level(top 10); (c) Differences in relative abundance of bacteria at the phylum level, 1. Proteobacteria, 2.Firmicutes, 3. Bacteroidota, 4. Verrucomicrobiota, 5. Planctomycetes; (d) Venn diagram analysis depicts the numbers of shared and unique OTUs. Values with * represent significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference between groups ($P < 0.01$); Different small letters represent significant difference ($P < 0.05$), and same small letters represent no significant difference among groups ($P > 0.05$). The same as below

和 RIG-I 样受体信号通路, 4 g/kg MOS 组肠道微生物介导的免疫系统的通路, 如溶酶体活性、IL-17 信号通路、抗原处理和呈递及 Th17 细胞分化, 表达量也显著升高 ($P < 0.05$)。另外, 在所有通路中, 8 g/kg MOS 组肠道微生物介导的通路表达量与低盐对照组无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 7)。

3 讨论

甲壳动物通过摄食吸收的物质和能量将被用于机体的基础代谢、生长、蜕皮和繁殖^[28]。有研究表明, 凡纳滨对虾在低盐条件下 (盐度为 3), 增重率和存活率会显著降低^[3]。本实验中, 低盐胁迫显著降低了对虾的增重率和特定生长率。

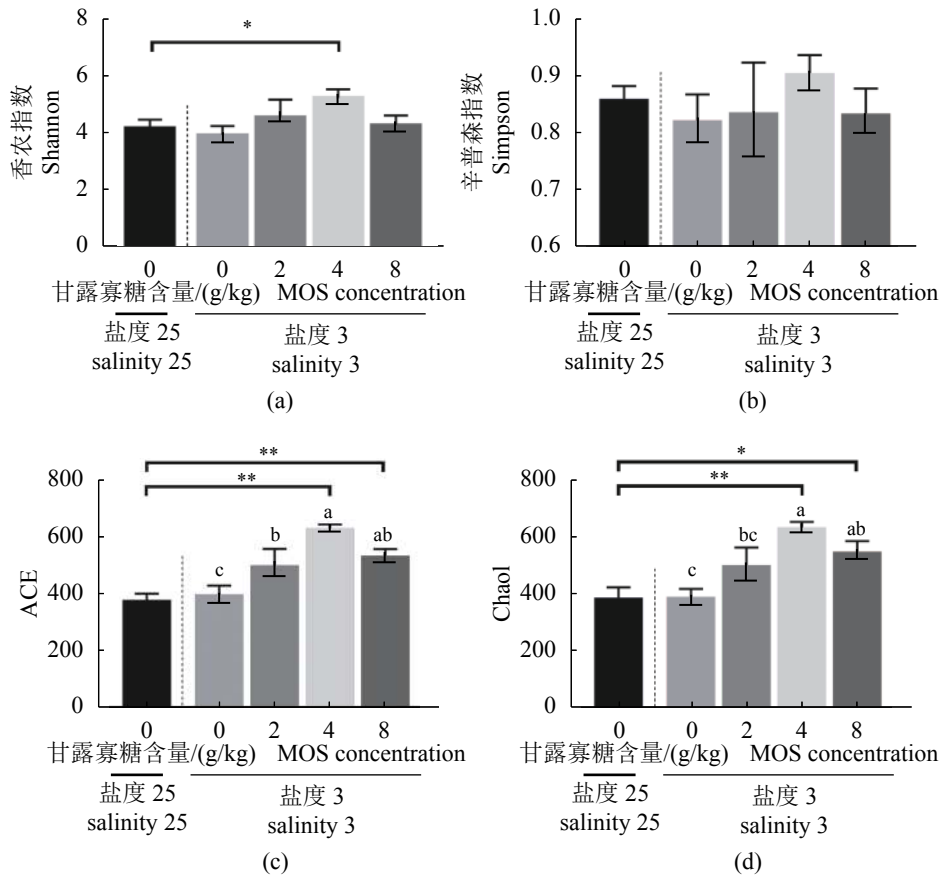


图 4 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾肠道菌群 α -多样性指数的影响

*表示表示组间差异显著 ($P < 0.05$), **表示组间差异极显著 ($P < 0.01$); 标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$), 下同

Fig. 4 Effects of different water salinity and dietary MOS concentration on the α -diversity indices of *L. vannamei*

Values with * represent significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference between groups ($P < 0.01$); Different small letters represent significant difference ($P < 0.05$), and same small letters represent no significant difference among groups ($P > 0.05$). The same below

造成这种结果的原因可能是: 在低盐条件下, 机体需要更多的能量维持体内渗透压平衡, 相应的用于自身生长的能量将会减少, 导致生长速率降低^[3]。饲料补充 MOS 后, 各组对虾的生长性能与海水对照组无显著性差异, 其中, 8 g/kg MOS 组对虾的生长性能显著高于低盐对照组, 表明饲料添加 MOS 能够缓解低盐胁迫对凡纳滨对虾的生长抑制作用, 而 8 g/kg MOS 对生长性能的提升作用更显著。同样地, 饲料添加 MOS 也显著提高了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[29]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[14] 和军曹鱼^[17] 等生长性能。在全虾体成分分析中发现, 3 个饲料添加 MOS 组对虾粗脂肪含量均显著高于 2 种盐度对照组。这与巨鲟 (*Huso huso*)、里海鳟 (*Salmo trutta caspius*) 饲料添加 MOS 的结果一致^[30-31]。也有研究表明, 2 g/kg MOS 对杂交石斑鱼 (*Epineph-*

elus lanceolatus♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀)^[15] 及 8 g/kg MOS 对尖吻重牙鲷 (*Diplodus puntazzo*)^[32] 的生长性能无显著影响, 这些差异可能与 MOS 的添加剂量、生物种类、生长阶段和养殖条件等因素有关, 因此在将其用于特定水生动物之前, 应对饲料添加 MOS 的效果进行评估。

正常情况下, 机体能通过产生少量的 ROS 增强对病原体的抵抗能力, 而过量的 ROS 会对细胞和机体造成氧化损伤^[33]。已有报道表明, 低盐胁迫可诱导机体发生氧化应激, 产生更多的 ROS^[12]。当体内 ROS 的产生和清除之间的平衡被破坏后, 就会发生脂质过氧化, 导致 MDA 和其他过氧化脂的积累, 因此 MDA 常作为细胞氧化损伤的评估指标^[13]。结果显示, 低盐胁迫显著降低了抗氧化酶活性 (T-SOD, GST), 并显著提高了肝胰腺 MDA 含量, 表明低盐环境降低了

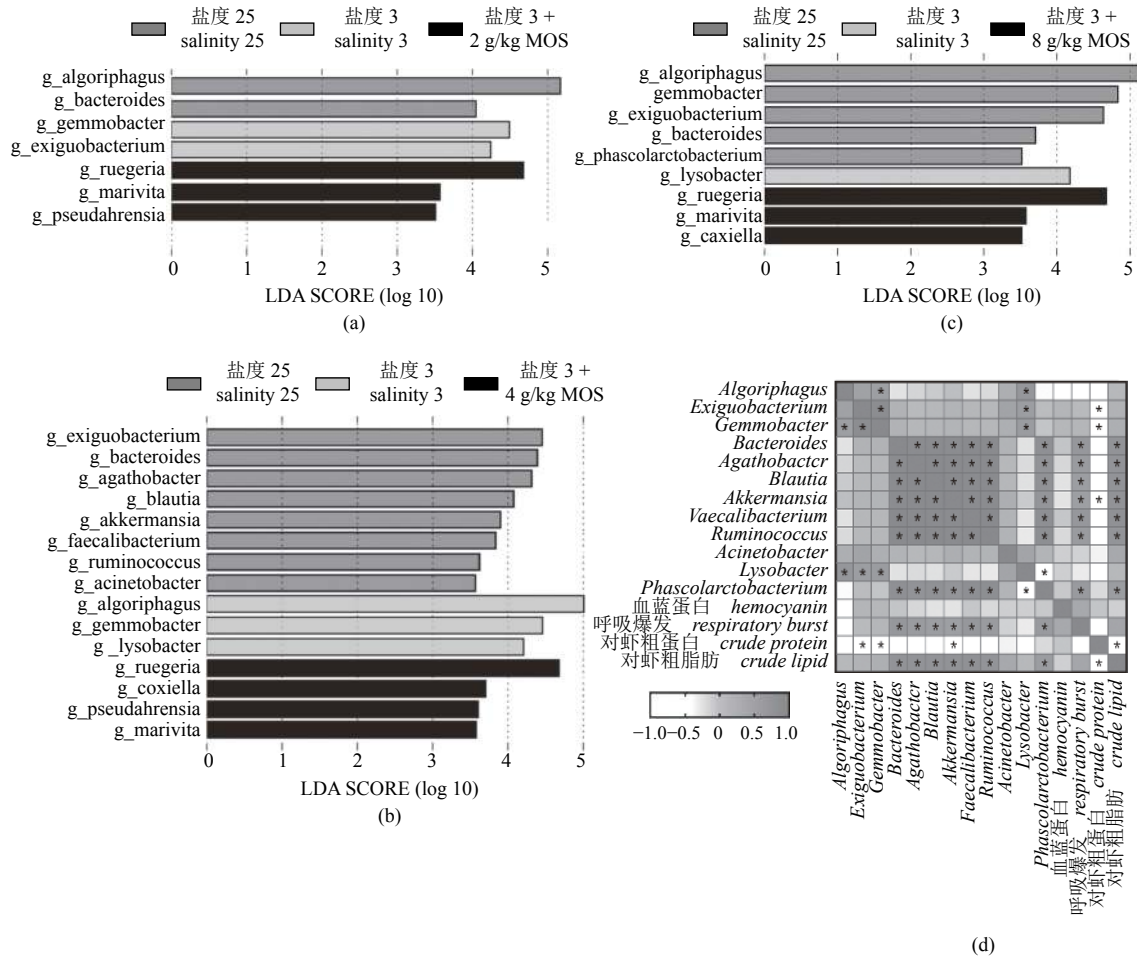


图 5 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾肠道代表微生物属、非特异性免疫参数、粗蛋白和粗脂肪的相关性分析

利用 LEfSe 分析了不同处理组间肠道菌群中的生物标志物 (LDA>3.5): (a) 海水对照组、低盐对照组和 2 g/kg MOS 组; (b) 海水对照组、低盐对照组和 4 g/kg MOS 组; (c) 海水对照组、低盐对照组和 8 g/kg MOS 组。 (d) 肠道代表微生物属、非特异性免疫参数、粗蛋白和粗脂肪相关性分析结果。颜色按 spearman 相关系数分布。深灰色表示正相关, 白色表示负相关, 浅灰色表示弱相关。星号表示相关性显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Correlation analysis of different water salinity and dietary MOS concentration on representative microbial genera, non-specific immunity parameters, crude protein and crude lipid of *L. vannamei*

The analysis of biomarkers in intestinal flora among different treatments identified by LEfSe (LDA >3.5). (a) Seawater control group, low salinity control group and (salinity 3+ 2 g/kg MOS) group; (b) Seawater control group, low salinity control group and (salinity 3 + 4 g/kg MOS) group; (c) Seawater control group, low salinity control group and (salinity 3 + 8 g/kg MOS) group; (d) Correlation analysis on representative microbial genera, non-specific immunity parameters and crude lipid. The color is according to the Spearman correlation coefficient distribution. Dark grey represents positive correlation, white represents negative correlation, and light grey represents weak correlation. Asterisks represent that the correlation was significant ($P < 0.05$)

凡纳滨对虾清除自由基的能力, 诱导了肝胰腺氧化应激, 造成脂质过氧化。饲料补充 MOS 后提高了对虾低盐胁迫条件下氧化应激的能力, 其中饲料添加 4 和 8 g/kg MOS 在抑制肝胰腺脂质过氧化, 缓解低盐胁迫对对虾造成的氧化损伤的效果更显著。同样, 在对中华绒螯蟹^[29]和草鱼^[14]的实验中发现饲料添加中等含量 MOS 能提高机体抗氧化能力, 抑制脂质过氧化, 提高

机体的健康状态。以上结果表明, 饲料中添加 4~8 g/kg MOS 能够有效抑制肝胰腺内脂质过氧化, 缓解低盐胁迫诱导产生的氧化损伤, 最终有效维持机体在低盐条件下的健康状态。

肠道菌群的结构和组成影响着宿主的营养吸收、免疫反应和能量平衡, 并受到多种因素的影响, 如饲料组成、环境因子和宿主生理状况等^[8,33-34]。NMDS 分析结果显示, 海水对照组与

表 3 各组肠道细菌群落共生网络的拓扑特性

Tab. 3 Topological properties of the intestinal microbiota co-occurrence network

	盐度25 salinity 25		盐度3 salinity 3		
	甘露寡糖含量/(g/kg) MOS concentration		甘露寡糖含量/(g/kg) MOS concentration		
	0	0	2	4	8
节点 node	43	35	45	40	46
边 edge	167	78	360	159	118
平均度 average degree(avgK) ^a	7.767	4.457	16	7.95	5.13
密度 density	0.185	0.131	0.364	0.204	0.114
模块化 modularity	0.329	0.626	0.383	0.51	0.711
中心性 centralization	0.206	0.142	0.166	0.163	0.113
异质性 heterogeneity	0.867	0.69	0.481	0.651	0.632
正/负相互作用/% positive/negative interaction	60.47/39.53	65.40/34.60	54.96/45.04	54.13/45.87	67.85/32.15

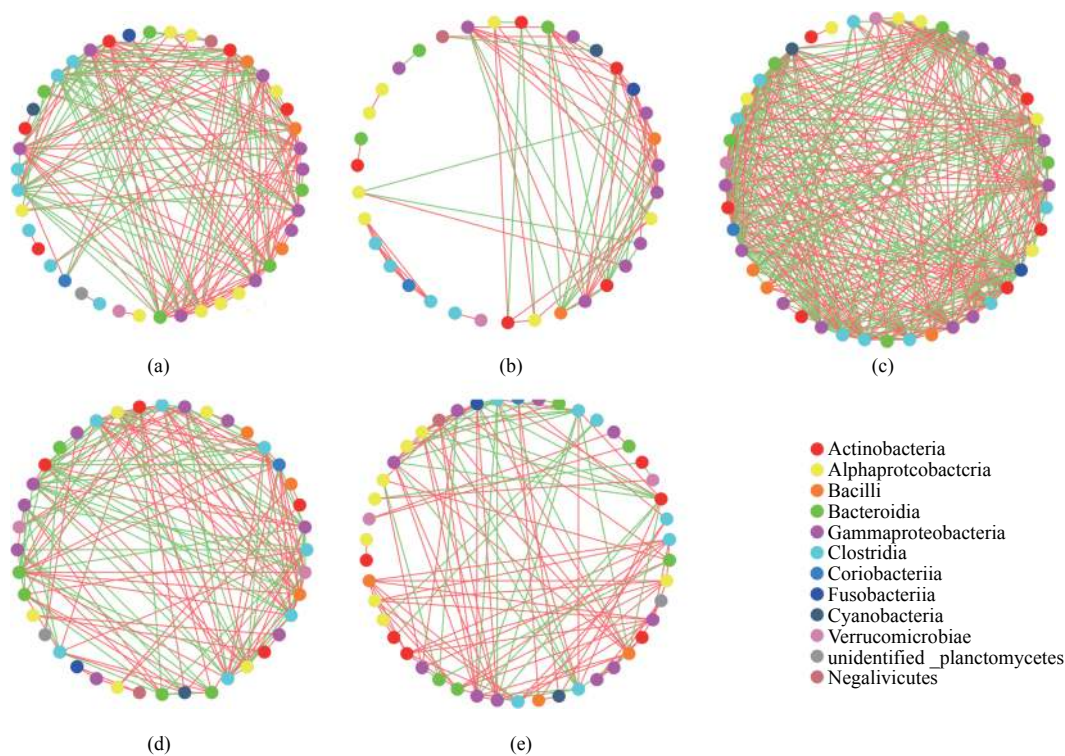


图 6 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾肠道菌群网络交互作用图的影响

(a) 海水对照组 (盐度 25); (b) 低盐对照组 (盐度 3); (c) 盐度 3 + 2 g/kg MOS 组; (d) 盐度 3 + 4 g/kg MOS 组; (e) 盐度 3 + 8 g/kg MOS 组。每个节点代表一个属, 不同的颜色表示隶属于不同的纲。两个独立节点间, 红边表示正交互作用, 绿边表示的负交互作用

Fig. 6 Effect of different water salinity and dietary MOS concentration on the ecological network of the intestinal microbiota in *L. vannamei*

(a) Seawater control (salinity 25); (b) Low salinity control (salinity 3); (c) Salinity 3 + 2 g/kg MOS; (d) Salinity 3 + 4 g/kg MOS; (e) Salinity 3 + 8 g/kg MOS. Each node represents a bacterial OUT (genus). Colors of the nodes indicate OTUs affiliated to different major classes. A red edge indicates a positive interaction, whereas a green edge indicates a negative interaction between two individual nodes

低盐条件下的各组均发生了明显分离。但在低盐条件下, 无论 MOS 添加剂量, 各处理组都没

有发生明显分离, 这与以前的结论相似, 即盐度在塑造肠道微生物结构和组成上发挥着重要

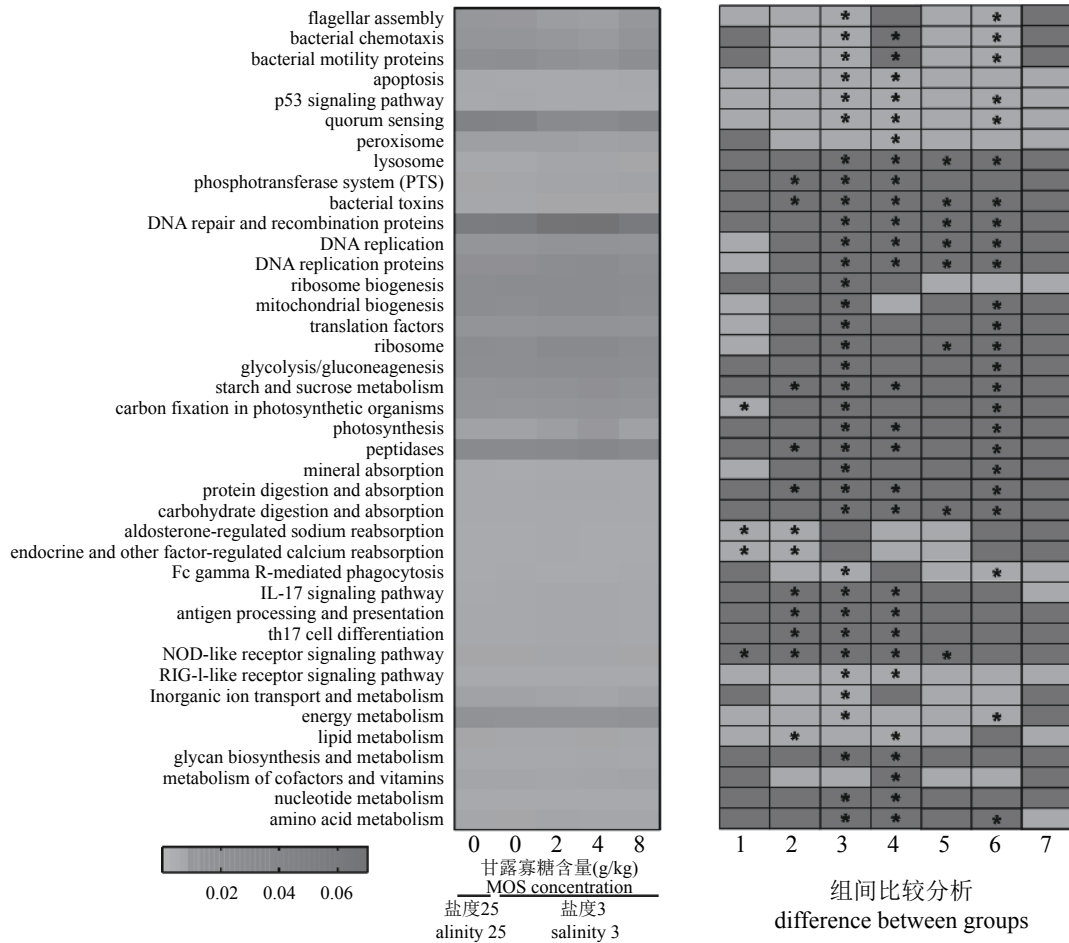


图 7 不同水体盐度与饲料 MOS 含量对凡纳滨对虾肠道菌群介导的功能比较

1. 海水对照组 (盐度 25) vs. 低盐对照组 (盐度 3); 2. 海水对照组 vs. 盐度 3+2 g/kg MOS 组; 3. 海水对照组 vs. 盐度 3+4 g/kg MOS 组; 4. 海水对照组 vs. 盐度 3+8 g/kg MOS 组; 5. 低盐对照组 vs. 盐度 3+2 g/kg MOS 组; 6. 低盐对照组 vs. 盐度 3+4 g/kg MOS 组; 7. 低盐对照组 vs. 盐度 3+8 g/kg MOS 组。深灰色: 表达量升高; 浅灰色: 表达量降低 (1-4, 与海水对照组比较, 5-7, 与低盐对照组比较)。* 表示表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 7 Effects of different water salinity and dietary MOS concentration on the gut bacterial-mediated KEGG pathways of *L. vannamei*

1. Seawater control (salinity 25) vs. Low salinity control (salinity 3); 2. salinity 25 vs. salinity 3+2 g/kg MOS; 3. salinity 25 vs. salinity 3+4 g/kg MOS; 4. salinity 25 vs. salinity 3+8 g/kg MOS; 5. salinity 3 vs. salinity 3+2 g/kg MOS; 6. salinity 3 vs. salinity 3+4 g/kg MOS; 7. salinity 3 vs. salinity 3+8 g/kg MOS; Dark grey represents increased pathway expression; light grey represents decreased pathway expression.(1-4, groups compared with salinity 25 group, 5-6, groups compared with salinity 3 group). Values with * represent significant difference between groups ($P < 0.05$)

作用^[8]。然而, 在饲料添加菊粉^[10]和β-葡聚糖^[11]的试验中发现, 饲料添加益生元能够显著改变低盐条件下对虾的肠道菌群聚类, 造成这种差异的原因可能是对虾肠道菌群对不同的益生元敏感度和利用效率不同。另外, 考虑到对虾缺乏特异性免疫, 因此较高的α多样性可能代表着宿主对病原菌的高抗性和对生存环境的适应性^[35]。在本实验中, 低盐胁迫未显著改变α多样性 (Shannon, Simpson, ACE, Chao1) 指数。饲料添加 MOS 后, 各组α多样性指数均有提高, 并在 4 g/kg MOS 达到最大值, 这说明饲料中 4 g/kg MOS 对

提高肠道菌群多样性和丰富度效果最好。同样, 在浅色黄姑鱼和凡纳滨对虾饲料添加益生元的实验中也发现了类似的结果^[10,36]。在门水平上, 凡纳滨对虾肠道核心菌群为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia), 这与以往对凡纳滨对虾肠道菌群的研究结果一致^[11]。在本实验中, 门水平下优势菌群相对丰度随着 MOS 添加量的增加而发生显著改变。其中, 饲料添加 4 g/kg MOS 显著提高了对虾肠道厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌

门相对丰度,并显著降低了变形菌门的相对丰度。有研究表明,变形菌门丰度的增加通常与肠道菌群失调或不稳定有关,因此变形菌门往往在受病原感染和生长缓慢的对虾肠道中丰度更高^[37-38]。拟杆菌门、厚壁菌门和疣微菌门能够降解难消化的多糖、发酵饲料纤维并产生短链脂肪酸,提高肠道完整性和连接强度^[39-41]。此外,有报道称,对虾肠道内拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度与碳水化合物降解效率相关,厚壁菌门与拟杆菌门的比例越高,肠道对营养物质的运输和消化能力越强^[13],但容易因培养环境和饲料中有效营养成分的影响而发生改变^[42]。在属水平,饲料添加不同浓度 MOS 对肠道微生物富集程度不同,而这些富集的细菌中的大多数(如拟杆菌属、布劳特氏菌属、艾克曼菌属、粪杆菌属和瘤胃球菌属)都是短链脂肪酸的产生者,在保持微生物稳态和宿主健康方面发挥着重要作用^[34,36,43-44]。尽管 MOS 添加水平不同,但拟杆菌属在 MOS 组中都得以富集,并在 4 g/kg MOS 中相对丰度最高,造成这种结果的原因,可能是拟杆菌属的成员能够通过协同作用利用并降解酵母 MOS^[45]。拟杆菌属可以产生碳水化合物代谢相关酶、维生素、聚糖和辅酶,促进食物消化^[46]。瘤胃球菌属在降解抗性淀粉和饲料纤维等不可消化碳水化合物方面发挥着重要作用^[44]。布劳特氏菌属能够利用复杂的碳水化合物^[47]。因此,这些细菌相对丰度的增加可以为宿主提供更多的营养和有益物质并促进宿主肠道健康,以帮助对虾适应低盐胁迫。另外,艾克曼菌属、瘤胃球菌属、布劳特氏菌属和粪杆菌属可以抑制低级别炎症的发生,减轻肠道屏障功能障碍^[47-49]。而考拉杆菌属能够通过消耗肠道内其他细菌产生的琥珀酸盐,有效地限制了肠道内艰难梭菌的生长,从而调节肠道平衡^[50]。由于益生元对肠道菌群的作用主要是通过特定的有益菌发酵来实现,因此拥有此类水解益生元所需酶的细菌在肠道内的生存更具优势^[51],而这些肠道内代表菌群相对丰度的变化表明了对虾对低盐环境和含 MOS 饲料的适应程度。从这些结果可以看出,饲料添加 MOS 能够通过改变对虾肠道菌群的组成和结构,提高对虾对营养物质的消化吸收并改善肠道健康,帮助对虾适应低盐环境。

物种间的相互作用反映了生物群落内推动共生的生态位过程,可用于推断群落聚集的稳

定性和生态特性^[52-53]。在本实验中,正相互作用在所有组中都占有更高的比例,表明在健康对虾肠道菌群中,相互协作活动更受到青睐。相比于低盐对照组和 8 g/kg MOS 组,海水对照组、2 和 4 g/kg MOS 组表现出了相对较低的正相互作用率。菌群间正相互作用常常代表着合作和协同关系,而负相互作用代表着捕食和竞争关系^[54]。有研究表明,在一个多样化的群落中,较高比例的竞争作用可以提高群落对病原菌入侵的能力,提高微生物群的稳定性^[55]。因此,从这个角度来看,低盐对照组和 8 g/kg MOS 组更容易感染疾病。同样,低盐对照组和 8 g/kg MOS 组也表现出了较低的网络复杂度、网络连通性和较高的模块化,而这也有可能增加疾病暴发的几率。这种模式与受到严重干扰可以破坏物种间相互作用强度的概念是一致的^[56]。

研究发现,肠道菌群间的相互作用决定了微生物介导的功能^[55]。同样地,本实验也在 KEGG 通路中发现了低盐条件下饲料中 MOS 调节对虾肠道菌群介导的功能的线索。与海水对照组相比,低盐对照组肠道菌群中与能量代谢和维持渗透压平衡相关的通路,仅光合作用生物的固碳作用、醛固酮调节的钠重吸收、内分泌和其他因子调节钙重吸收,表达量显著降低,表明低盐环境在一定程度上影响了对虾对营养物质的吸收和维持体内渗透压的能力。在 4 g/kg MOS 组中,对虾参与能量代谢的多个通路,如糖酵解/糖异生、淀粉和蔗糖代谢、光合生物的固碳作用、光合作用、肽酶、蛋白质消化和吸收、碳水化合物的消化和吸收及矿物质吸收通路表达量显著升高,表明 MOS 能够通过提高低盐胁迫下对虾肠道微生物对营养物质的吸收和利用,为对虾提供更多的能量以应对低盐环境。另外, MOS 作为免疫刺激原,在水生动物的免疫刺激和疾病预防方面发挥着积极作用^[11]。从这个角度来看, MOS 组中参与免疫的通路,如溶酶体活性、IL-17 信号通路、抗原处理和呈递及 Th17 细胞分化,表达量显著上调,这可能意味着饲料中 MOS 通过激活宿主免疫应答,从而提高了宿主的免疫能力,而这一结果也在本实验测定的免疫指标中得到了验证。这些结果说明饲料添加 MOS 能够通过调节肠道微生物介导的功能缓解低盐胁迫对凡纳滨对虾造成的多种不

良影响, 从而提高对虾应对低盐环境的能力。

4 结论

研究表明, 饲料添加 MOS 提高了凡纳滨对虾低盐养殖条件下的生长性能、抗氧化能力和免疫力。此外, MOS 还改变了肠道菌群组成和结构, 并通过调节肠道微生物介导的功能, 如提高对虾对营养物质的吸收利用和免疫力, 提高了凡纳滨对虾对低盐环境的适应能力。另外, 饲料中不同浓度 MOS 对凡纳滨对虾的益生效果表明, 饲料中添加 4 g/kg MOS 可有效提高低盐环境下凡纳滨对虾的养殖效果。

参考文献 (References):

- [1] Li E C, Wang X D, Chen K, *et al.* Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 9(1): 57-75.
- [2] Boonanuntanasarn S, Wongsasak U, Pitaksong T, *et al.* Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(4): 837-845.
- [3] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 385-390.
- [4] Ponce-Palafox J T, Pavia Á A, Mendoza López D G, *et al.* Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 312-321.
- [5] Pinheiro I, Carneiro R F S, Vieira F D N, *et al.* Aquaponic production of *Sarcocornia ambigua* and Pacific white shrimp in biofloc system at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734918.
- [6] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 80-86.
- [7] Xu C, Li E C, Liu Y, *et al.* Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 162: 1-10.
- [8] Zhang M L, Sun Y H, Liu Y K, *et al.* Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 72-80.
- [9] Gainza O, Romero J. Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2719.
- [10] Zhou L, Li H F, Qin J G, *et al.* Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734847.
- [11] Li H F, Xu C, Zhou L, *et al.* Beneficial effects of dietary β -glucan on growth and health status of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 315-324.
- [12] Soleimani N, Hoseinifar S H, Merrifield D L, *et al.* Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(2): 316-321.
- [13] Zheng L, Xie S W, Zhuang Z X, *et al.* Effects of yeast and yeast extract on growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735941.
- [14] Lu Z Y, Feng L, Jiang W D, *et al.* Mannan oligosaccharides improved growth performance and antioxidant capacity in the intestine of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100313.
- [15] Ren Z L, Wang S F, Cai Y, *et al.* Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and immune-related gene expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀)[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735195.
- [16] Dawood M A O, Koshio S, Fadl S E, *et al.* The modulatory effect of mannanoligosaccharide on oxidative status,

- selected immune parameters and tolerance against low salinity stress in red sea bream (*Pagrus major*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 16: 100278.
- [17] Salze G, McLean E, Schwarz M H, *et al.* Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 148-152.
- [18] Huu H D, Jones C M. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on juvenile spiny lobster *Panulirus homarus* (Palinuridae)[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 258-264.
- [19] Chen M, Chen X Q, Tian L X, *et al.* Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100408.
- [20] Yang L B, Pan L Q. Effects of phosphatidyl serine on immune response in the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Open Life Sciences*, 2013, 8(11): 1135-1144.
- [21] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1994, 18(3): 201-209.
- [22] Cheng W, Liu C H, Yeh S T, *et al.* The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(1): 41-51.
- [23] Haas B J, Gevers D, Earl A M, *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [24] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [25] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [26] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [27] Abhauer K P, Wemheuer B, Daniel R, *et al.* Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2882-2884.
- [28] Mootz C A, Epifanio C E. An energy budget for *Menippe mercenaria* larvae fed *Artemia* nauplii[J]. *The Biological Bulletin*, 1974, 146(1): 44-55.
- [29] Lu J T, Qi C L, Limbu S M, *et al.* Dietary mannan oligosaccharide (MOS) improves growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and intestinal histology of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 337-346.
- [30] Mansour M R, Akrami R, Ghobadi S H, *et al.* Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(3): 829-835.
- [31] Jami M J, Kenari A A, Paknejad H, *et al.* Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 202-208.
- [32] Piccolo G, Centoducati G, Marono S, *et al.* Effects of the partial substitution of fish meal by soy bean meal with or without mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of sharpnose seabream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): preliminary results[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2011, 10(3): e37.
- [33] Claus S P, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: A major player in the toxicity of environmental pollutants?[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2016, 2: 16003.
- [34] Hou D W, Huang Z J, Zeng S Z, *et al.* Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3701-3709.
- [35] Xiong J B, Dai W F, Qiu Q F, *et al.* Response of host-bacterial colonization in shrimp to developmental stage, environment and disease[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(18): 3686-3699.
- [36] Li Z Z, Tran N T, Ji P N, *et al.* Effects of prebiotic mixtures on growth performance, intestinal microbiota and

- immune response in juvenile chu's croaker, *Nibea coibor*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 564-573.
- [37] Su C, Fan D P, Pan L Q, *et al.* Effects of Yu-Ping-Feng polysaccharides (YPS) on the immune response, intestinal microbiota, disease resistance and growth performance of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 105: 104-116.
- [38] Holt C C, Bass D, Stentiford G D, *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020, doi: 10.1016/j.jip.2020.107387.
- [39] Cardman Z, Arnosti C, Durbin A, *et al.* *Verrucomicrobia* are candidates for polysaccharide-degrading bacterioplankton in an arctic fjord of Svalbard[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3749-3756.
- [40] Gholizadeh P, Mahallei M, Pormohammad A, *et al.* Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 48-55.
- [41] Monk J M, Lepp D, Wu W Q, *et al.* Chickpea-supplemented diet alters the gut microbiome and enhances gut barrier integrity in C57Bl/6 male mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 663-674.
- [42] Li E C, Xu C, Wang X D, *et al.* Gut microbiota and its modulation for healthy farming of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2018, 26(3): 381-399.
- [43] Wang Y T, Li L L, Ye C Q, *et al.* Alginate oligosaccharide improves lipid metabolism and inflammation by modulating gut microbiota in high-fat diet fed mice[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3541-3554.
- [44] Rimoldi S, Torrecillas S, Montero D, *et al.* Assessment of dietary supplementation with galactomannan oligosaccharides and phytonics on gut microbiota of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fishmeal and fish oil based diet[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231494.
- [45] Cuskin F, Lowe E C, Temple M J, *et al.* Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism[J]. *Nature*, 2015, 517(7533): 165-169.
- [46] Duan Y F, Xiong D L, Wang Y, *et al.* Toxic effects of ammonia and thermal stress on the intestinal microbiota and transcriptomic and metabolomic responses of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 141867.
- [47] Yilmaz B, Juillerat P, Øyås O, *et al.* Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(2): 323-336.
- [48] Zhang Z, Wu X Y, Cao S Y, *et al.* Caffeic acid ameliorates colitis in association with increased *Akkermansia* population in the gut microbiota of mice[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31790-31799.
- [49] Zhou Y, Zhang M H, Liu Q X, *et al.* The alterations of tracheal microbiota and inflammation caused by different levels of ammonia exposure in broiler chickens[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(2): 685-696.
- [50] Nagao-Kitamoto H, Leslie J L, Kitamoto S, *et al.* Interleukin-22-mediated host glycosylation prevents *Clostridioides difficile* infection by modulating the metabolic activity of the gut microbiota[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(4): 608-617.
- [51] Guerreiro I, Oliva - Teles A, Enes P. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(4): 800-832.
- [52] Williams R J, Howe A, Hofmockel K S. Demonstrating microbial co-occurrence pattern analyses within and between ecosystems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 358.
- [53] Shade A, Peter H, Allison S D, *et al.* Fundamentals of microbial community resistance and resilience[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 417.
- [54] Fuhrman J A. Microbial community structure and its functional implications[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 193-199.
- [55] Xiong J B, Dai W F, Zhu J Y, *et al.* The underlying ecological processes of gut microbiota among cohabitating retarded, overgrown and normal shrimp[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(4): 988-999.
- [56] van Altena C, Hemerik L, Heesterbeek J A P, *et al.* Patterns in intraspecific interaction strengths and the stability of food webs[J]. *Theoretical Ecology*, 2016, 9(1): 95-106.

Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth, health and intestinal microbiota of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinity

TANG Shangshang¹, HAN Fenglu^{1*}, ZHOU Li¹, LIU Shiyu¹,
XU Chang¹, CHEN Liqiao², LI Erchao^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology of Hainan Province, Aquaculture Breeding Engineering Research Center, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of various levels of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth performance, antioxidant capacity, immunity and intestinal microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinity (salinity 3). Juvenile shrimp (0.68 ± 0.01 g) were selected and fed experimental diets containing different MOS concentration (2, 4, or 8 g/kg) for 42 days. The shrimp fed 0 g/kg MOS diet at salinity 25 and 3 were served as seawater control and low salinity control, respectively. The results showed that: 1) The weight gain rate and specific growth rate of shrimp in low salinity control were significantly reduced compared with those in seawater control ($P < 0.01$). When compared with low salinity control, these parameters together with condition factor in 8 g/kg MOS group and specific growth rate in 4 g/kg MOS group were significantly increased ($P < 0.05$). 2) Compared with the seawater control, total superoxide dismutase activity and glutathione S-transferase activity of hepatopancreas in all low salinity groups were decreased significantly ($P < 0.05$). Malondialdehyde content in shrimp fed the 0 and 2 g/kg MOS diets were significantly increased ($P < 0.05$), while that returned to seawater control level in 4 and 8 g/kg MOS groups ($P > 0.05$). 3) α -diversity analysis showed that hyposaline stress had no significant effect on Shannon, Simpson, ACE and Chao1 indexes ($P > 0.05$), while ACE and Chao1 indexes in shrimp fed the 4 and 8 g/kg MOS diets were more significantly improved than two control groups ($P < 0.05$). In addition, β -diversity analysis showed that the intestinal microbiota of shrimp in seawater control was clearly separated from those 4 groups under hyposaline stress. 4) Compared with two control groups, the relative abundance of Proteobacteria in shrimp fed 2 and 4 g/kg MOS diets were significantly decreased ($P < 0.05$), while Firmicute and Verrucomicrobiota were increased significantly ($P < 0.05$). 5) Function prediction analysis by Tax4Fun showed that, compared with seawater control, low salinity stress had a subtle effect on intestinal microbial-mediated functions. While in 4 g/kg MOS group, most pathways related to energy metabolism and immunity at L3 level were significantly improved ($P < 0.05$). To sum up, all results suggest that dietary MOS can promote the growth performance, improve antioxidant capacity, and immune system in *L. vannamei* at low salinity, and shape intestinal microbiota structure and composition to help *L. vannamei* cope with hyposaline stress, and dietary 4 g/kg MOS supplementation can be optimal for the healthy culture of *L. vannamei* at low salinity.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; low salinity; mannan oligosaccharide; growth performance; antioxidant capacity; intestinal microbiota

Corresponding authors: HAN Fenglu. E-mail: hanfenglu@163.com; LI Erchao. E-mail: ecl@bio.ecnu.edu.cn

Funding projects: The Research and Development Program Project in Key Areas of Guangdong Province (2020B0202010001); National Natural Science Foundation of China (32060832); the National Key R & D Program of China (2018YFD0900400); the Initial Fund from the Hainan University for R & D [KYQD(ZR)1736]