



池塘内循环流水养殖模式对大口黑鲈生长性能、抗氧化酶、 消化酶及消化道组织结构和菌群的影响

刘梅, 练青平, 倪蒙, 郭爱环, 原居林*

(浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室,
浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江湖州 313001)

摘要: 为探究养殖过程中池塘内循环流水养殖模式 (inner-pond raceway aquaculture, IPRA) 对大口黑鲈生长性能、抗氧化酶、消化酶、消化道组织结构及菌落结构的影响。实验将池塘内循环流水养殖的 4 条水槽设置为流水组 2 条和对照组 2 条, 进行为期 153 d 的养殖实验, 分别在养殖中期和末期测量大口黑鲈相关生长、生化指标及观察组织形态结构, 并采用 Illumina Miseq 测序平台对消化道中的微生物进行分析。结果显示, ①养殖中期, 流水组的增重率、特定生长率和肥满度低于对照静水组; 至养殖末期, 流水组的增重率、特定生长率和肥满度持续下降, 但成活率一直高于静水组。②养殖中期, 流水组肝脏 SOD 和 CAT 显著高于静水组, 流水组 MDA 显著低于静水组, 流水组消化酶活性显著高于静水组; 至养殖末期, 抗氧化酶和消化酶均不同程度下降, 但流水组 SOD 仍显著高于静水组, MDA 显著低于静水组。③流水组大口黑鲈肠绒毛高度及密度均明显高于静水组, 且养殖中期分泌消化酶较多, 运动加强了肠道消化吸收功能。④养殖中期, 流水养殖使大口黑鲈肠胃菌群的物种多样性和均匀度明显增高, 至养殖末期, 流水组的肠胃多样性和均匀度指数不断下降; 养殖中期流水组和静水组胃分别为柔膜菌门和蓝细菌, 静水组肠主要优势菌依次为变形菌门和厚壁菌门, 流水组肠主要优势菌依次为厚壁菌门和变形菌门; 至养殖后期时, 流水组和静水组胃肠优势菌群均为柔膜菌门; 而养殖水体的优势菌为变形菌门和放线菌门。研究表明, IPRA 模式下的持续运动会降低其生长指标, 但能够提高其成活率, 增强其免疫和消化能力, 改善肠胃菌群结构, 尤其是处于生长期效果更明显, 而至养殖末期运动状态可能会打破肠道菌群平衡, 引发疾病, 应加强养殖管理。

关键词: 大口黑鲈; 池塘内循环流水养殖模式; 生长性能; 抗氧化酶; 消化酶; 组织形态; 菌群结构

中图分类号: S 964

文献标志码: A

随着野生渔业资源的日益枯竭以及消费者对鱼类品质要求的不断提高, 流水养鱼这种不

仅能够提高渔业产量又能改善鱼肉品质的生态养殖模式正越来越受到人们的关注^[1]。池塘内循

收稿日期: 2021-04-07 修回日期: 2021-05-20

资助项目: 国家重点研发计划 (2020YFD0900105); 湖州公益性应用研究项目 (2019GZ17); 浙江省农业重大技术协同推广项目 (2020XTTGSC01); 湖州市乡村振兴专项 (2018ZD2025); 浙江省属院所扶持专项 (2021YSZX006)

第一作者: 刘梅(照片), 从事养殖水域生态修复研究, E-mail: liumei@zju.edu.cn

通信作者: 原居林, E-mail: Yuanjulin1982@126.com



环流水养殖 (inner-pond raceway aquaculture, IPRA) 由美国奥本大学设计, 简称“跑道养殖”, 于 2013 年通过美国大豆出口协会引入我国, 是传统常规池塘养殖 (usual pond aquaculture, UPA) 模式经过工程化改造, 形成高密度循环水养殖水槽和池塘生态净水区相结合的新型复合养殖系统, 是对传统池塘养殖的革命性改变^[2-3]。与 UPA 相比, IPRA 养殖技术具有水资源利用效率高, 养殖水体水质好, 整个投喂管理和捕捞仅在水槽内进行即可。由于其清洁、安全、方便的生产符合生态保护理念, 近年来在我国各地得到普遍应用, 是有效解决当前水产养殖问题的新型养殖模式之一。据不完全统计, 截至 2019 年底, 全国建成的淡水池塘 IPRA 水槽就有 2 000 条以上, 推广面积近 1 000 ha^[4]。

国内已开展了 IPRA 系统养殖草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[5]、青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[6]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[7]、大口黑鲈 (*Micropterus salmonides*)^[8]、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[9] 以及吉富罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*)^[10] 等多个品种实验, 相关研究主要从水质改善、病害防治、驯化技巧、市场效益等方面进行了总结分析。本团队经过几年的养殖探索, 已证明大口黑鲈是最适宜 IPRA 养殖模式的主要品种之一, 取得了较好的生态和经济效益。目前原居林等^[8] 开展了 IPRA 和 UPA 对大口黑鲈生长性能、形体指标和肌肉营养成分影响的研究; 王裕玉等^[11] 研究证实 IPRA 水槽高密度养殖不影响大口黑鲈的正常生长; 张雷鸣等^[12] 研究发现, 在高温季节, IPRA 养殖水体中蓝藻密度和生物量少于 UPA, 可有效降低蓝藻暴发的风险。此外, 以往研究都是 IPRA 池塘和传统池塘之间开展对比研究, 2 种池塘养殖密度、池塘水质理化指标、浮游生物等均存在较大差异, 势必会对结果产生一定影响。同时, 关于不同生长阶段同一养殖环境下 IPRA 养殖模式对免疫性能、消化能力以及肠道菌群的研究还未见报道。

在鱼类肠道微生物生态系统中, 各种微生物与宿主经过长期的协同进化, 在调节宿主生理生化反应、促进消化吸收、介导宿主免疫应答和抵制宿主疾病发生等方面发挥着重要作用, 以至于被认为是动物额外的器官^[13]。然而, 肠道菌群不是一成不变的, 会因环境、饵料、宿主行

为、分化阶段和基因型等的不同有所差异^[13-14]。Li 等^[15] 认为鱼类肠道菌群结构与宿主的个体发育程度密切相关; 王晨赫等^[16] 研究发现, 饥饿会造成石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 肠道内菌群结构发生变化, 随着我国水产养殖业的快速发展, 研究养殖生物肠道菌群的结构及演替规律可为生态健康养殖技术提供理论支撑。而 IPRA 模式中, 由于水流刺激, 养殖对象一直处于运动状态, 而运动作为一种可有效促进机体健康的环境刺激性因素, 能够调节宿主的肠道菌群结构^[17], 而运动对机体 (尤其是胃肠) 的影响受生长阶段、运动强度、运动持续时间等多种因素的影响。目前关于运动对鱼类机体营养代谢、生理状态、组织结构及胃肠菌群的相关研究还十分匮乏。鉴于此, 本研究通过在同一池塘中设置流水组和对照静水组, 分析同一养殖环境下不同生长阶段 IPRA 模式对生长指标、免疫性能、消化能力以及胃肠菌群的影响, 为 IPRA 模式大口黑鲈健康养殖提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 实验地点与设施

在浙江省湖州市南浔区勤劳村现代渔业园区选取本实验所需的养殖模式。其中, 选择 1 个水域面积 2.2 ha 的 IPRA 模式池塘, 池塘安装有 4 条流水养殖槽, 生态净水区投放鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*H. nobilis*) 等滤食性鱼类, 水面利用生态浮床种植野天胡荽 (*Hydrocotyle vulgaris*)、狐尾藻 (*Myriophyllum verticillatum*) 等耐低温水生植物, 并配有 4 台水车式增氧机 (2.0 kWh/台), 其中 2 台分别位于养殖水槽中间位置前端和后端 70 米处, 而另外 2 台则对称分布在池塘另一侧 (图 1)。其中, IPRA 循环水槽主体采用玻璃钢, 规格为 (长 25.0 m×宽 21.0 m×深 2.5 m), 由 4 条独立水槽组成, 每条水槽的规格为 (长 22.0 m×宽 5.0 m×深 2.5 m), 集污槽在流水槽后部, 规格为 (长 21.0 m×宽 3.0 m×深 2.5 m)。水槽后端设有生物栅, 即在水槽后端 10 m 处开始种植 210 m² 盆栽荷花 (长 21.0 m×宽 10.0 m), 通过水生植物的根部吸收和茎叶的拦截, 达到有效减少不同形态内源氮磷的集中释放, 降低外塘水质净化压力。另外, 池塘靠近水槽的一侧建有 1 个集污池, 规格为 (长 8.0 m×宽 3.0 m×深 2.0 m), 连

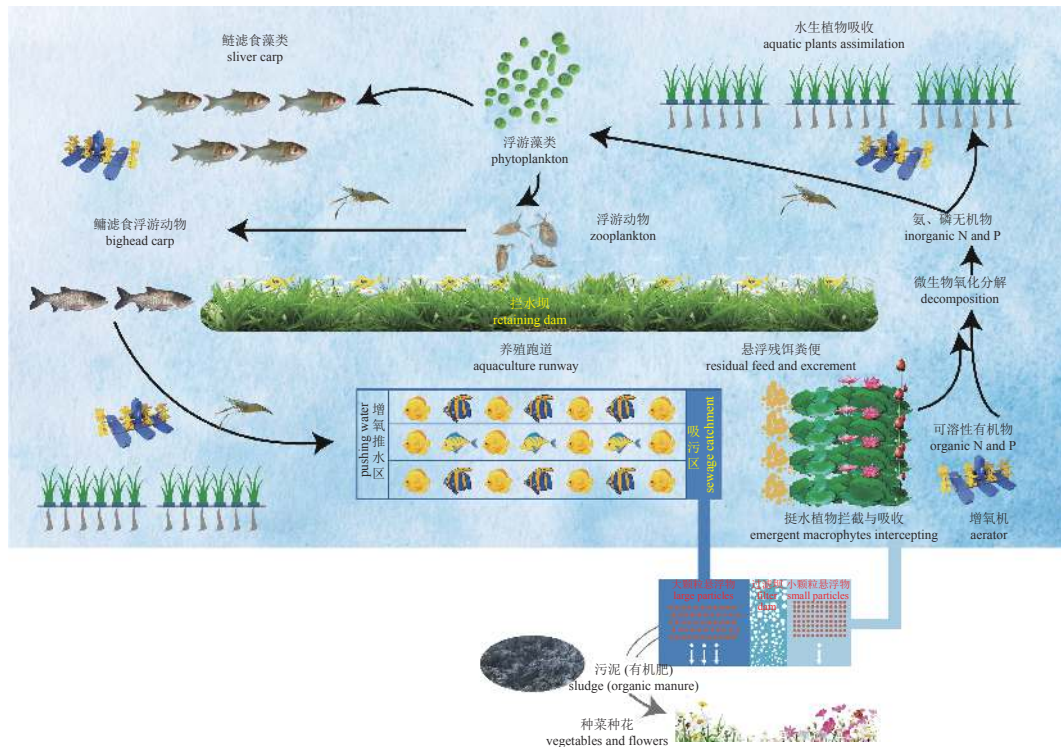


图1 IPRA示意图

Fig. 1 Schematic diagram of IPRA

接1条(长30.0 m×宽0.6 m×深0.5 m)的过滤渠, 过滤渠内铺设火山石滤料。池塘循环水槽养殖系统设备主要由4套气提式推水增氧系统、1套底层增氧系统及1套吸污系统组成。

1.2 养殖管理

在IPRA池塘放养规格为(8.31±1.20) g的已驯食好的健康大口黑鲈苗种, 每条水槽养殖数量保持一致, 均为15000尾, 外塘净水区投放规格为(35.0±7.5) g的鲢、鳙鱼种, 放养密度分别为1500和500尾/ha, 其中IPRA鲢、鳙投放到生态净水区, 实验期间水位保持在(2.0±0.1) m。2种模式每天6:00、12:00、18:00时投喂3次饲料, 最初投喂的日饵料量约占鱼总体质量的2%~3%, 以后视前一天的摄食量和天气情况作适当调整, 并做好相关生产记录。

4条养殖水槽底增氧装置24 h运行(除喂食外), 其中1号和3号水槽作为对照组, 统称静水组(简称为C), 2号和4号水槽作为处理组, 统称为流水组(简称为T)。2号和4号水槽推水设备24 h运行(除喂食外), 前端水流速度为(0.51±0.05) m/s, 后端水流速度为(0.12±0.02) m/s, 喂食结束20 min后开启每条水槽的推水设备, 30 min后关闭1号和3号的推水设备, 同时打开养殖水槽后

端的吸污装备30 min, 最大程度的将粪便和残饵转移到集污池, 作无害化处理。整个实验期间除根据需要补充因蒸发及渗透而丢失的水以外, 一直不换水。养殖实验从2019年4月15日开始在水槽内进行鲈鱼苗驯食, 驯食成功后于6月1日进行投放, 养殖实验开始, 于2019年12月1日结束, 共养殖153 d。实验所用配合饲料购自浙江联兴饲料科技有限公司, 其干物质主要成分: 粗蛋白质(43.25%±0.29%)、粗脂肪(6.24%±0.72%)、粗纤维(5.12%±0.26%)、灰分(15.21%±0.18%)。

1.3 生长性能和酶活性指标测定

为了跟踪监测大口黑鲈生长指标、形体指标、组织结构以及肠胃微生物的变化情况, 分别在养殖初期、养殖中期、养殖末期各采样1次。其中6月1号养殖放苗时定义为养殖初期, 仅测定了相关生长指标; 生长旺盛期定义为养殖中期, 于9月1号采样; 越冬期定义为养殖末期, 于12月1号采样。整个养殖期间, 4条水槽的水环境状况良好, 且由于外塘增氧机的推水作用, 4条水槽水质变化差异不大。

生长指标测定 每次采样前禁食24 h, 4个水槽中各随机抽取30尾大口黑鲈, 现场准

确测定其体质量、体长,并用消毒后的剪刀、镊子剖取其内脏、肝脏和脂肪,称其重量,计算大口黑鲈增重率(WGR,%)、特定生长率(SGR,%/d)和存活率(SR,%),同时根据体长和体质量计算肥满度(CF, g/cm³):

$$WGR=(W_t-W_0)/W_0\times 100\%$$

$$SGR=[\ln(W_t)-\ln(W_0)]/t\times 100\%$$

$$SR=S_t/S_0\times 100\%$$

$$CF=W/L^3\times 100$$

式中, W_t 表示养殖 t 时间时的体质量; W_0 表示实验开始时体质量; L 表示体长; S_t 表示养殖 t 时间时成活的尾数; S_0 表示实验开始时养殖尾数。

酶活性指标测定 每条水槽随机抽取 5 尾大口黑鲈,用 75% 乙醇擦拭鱼体表后用蒸馏水漂洗,将剖取的全肠和肝脏置于冰面上的玻璃培养皿中,迅速清除肠道外壁和肝脏附着的脂肪,并用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗整条肠道外壁和肝脏,然后按照大口黑鲈肠道本身的特性,将其分为前肠、中肠和后肠 3 段,每尾鱼分别将长度约 1 cm 的前、中、后肠道组织放入无菌 5 mL 离心管中,立即放入液氮罐中,尽快带回实验室放入 -80 °C 冰箱冷藏,用于提取肠道菌落总 DNA。另外取 2~3 cm 的中肠和约 1 g 肝脏同一位置的组织分别放入 2 mL 的无菌离心管中,剩下的肝脏放入 5 mL 的离心管中,立即放入液氮罐中,带回实验室后将肝脏和肠道样品放入 -80 °C 冰箱冷藏,用于抗氧化酶和消化酶指标的测定。

需要检测活性的抗氧化指标包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA),消化酶包括脂肪酶(LPS)、淀粉酶(AMS)和蛋白酶(PTS),6 种酶活性的测定均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,具体测定方法严格按照试剂盒的说明进行。蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法测定,采用酶标仪测定吸光度值。

1.4 组织切片、扫描电镜和透射电镜制样

组织固定 实验结束时,每条水槽随机抽取 3 尾大口黑鲈,剖取肠道,取中部肠道组织米粒大小 3 份,1 份放入 Bouin 液中,2 份放入戊二醛电镜固定液中。

组织切片制样 Bouin 液中的肠道组织固定 24 h 后,用乙醇逐级脱水,石蜡包埋后切片,苏

木素-伊红(H.E)染色,用 Motic BA210 光学显微镜观察并拍照。

扫描电镜制样 电镜固定液的肠道经 PBS 洗涤 2 次,用 4%(质量体积比)的蔗糖溶液洗涤 1 次,用系列梯度乙醇脱水,加入 100% 乙醇重悬后,吸取少量悬液滴加在玻片上,将玻片轻轻粘在导电胶上,临界点干燥,真空喷镀,在 SU8100(Hitachi 公司)型扫描电镜下观察与摄片。

透射电镜制样 电镜固定液的肠道经 1% 锇酸后固定 1.5 h, PBS 漂洗 3 次,70% 乙醇饱和醋酸铀染液块染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋,超薄切片 80 nm,醋酸铀、枸橼酸铅各染色 5 min,在 H7650 型透射电镜下观察与摄片。

1.5 微生物测定

肠道样品取样 每次采样直接用无菌采水袋采集 4 条水槽中间位置的养殖水体 2 L,经 0.22 μm 孔径的醋酸纤维滤膜过滤,过滤后的滤膜采用灭菌的镊子装入无菌袋中,立即放入 -80 °C 超低温冰箱保存备测。

总 DNA 提取、PCR 扩增及 16S rRNA 测序 从 -80 °C 冰箱中取出样品,无菌条件下剪碎滤膜,参照 DNA 提取试剂盒(TIANamp Soil DNA Kit)方法提取水环境 DNA,肠道细菌总 DNA 的提取采用 bacterial DNA Kit 试剂盒(Omega, 美国),具体步骤参照试剂盒说明。以提取的基因组 DNA 作为模板进行 16S rRNA 基因 V4-V5 区扩增特异区域,其引物为 515F(5'-GTGCCAGCMGCGCG G-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTA AT-3')。PCR 采用 TransGen AP221-02,反应体系 20 μL: 5×FastPfu 缓冲液 5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL、5 μmol/L 正、反引物各 1.0 μL、FastPfu 聚合酶 0.5 μL、BSA 0.25 μL、DNA 模板 10 ng,补双蒸水至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应在 PCR 反应仪 9700 (Applied Biosystems® GeneAmp®, CA, 美国)上进行。扩增完成后的 PCR 产物使用 Beads 纯化之后进行上机测序,送到上海元莘生物科技有限公司(上海, 中国)进行基于 Illumina PE250 平台的高通量测序。每条水槽的养殖水体样品编号分别为 T1、T2、T3 和 T4,静水槽肠道样品编号分别为 C1.1、C1.2、C3.1 和 C3.2,统称为 control.C; 流水槽肠道样品编号为 C2.1、C2.2、C4.1

和 C4.2, 统称为 treatment.C; 静水槽胃样品编号分别为 W1.1、W1.2、W3.1、W3.2, 统称为 control.W; 流水槽胃样品编号为 W2.1、W2.2、W4.1 和 W4.2, 统称为 treatment.W。

高通量数据生物学信息分析 Illumina PE250 测序序列首先需要根据 barcode 得到所有样品的有效序列; 然后对 reads 进行质控过滤; 接着根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对的 reads 拼接 (merge) 成一条序列; 最后按照 barcode 和引物序列拆分得到每个样本的优质序列, 并在过程中根据正反 barcode 和引物方向校正序列方向以及去除嵌合体, 获得优化后的 clean reads 数据, 并对其进行归一化, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU) 代表序列进行 OTUs 聚类分析和物种分类学分析。使用 Mothur (V 1.30.1) 软件计算每个样本的 Alpha 多样性指数。使用 97% 相似度的 OTU, 利用 Mothur 做 rarefaction 分析, 利用 R 语言工具制作曲线图。群落结构组分图在 Excel 软件中编辑绘制。群落聚类树和 Heatmap 组合图采用 HemI 1.0 软件进行绘制, 其中采用 Bray-curtis 算法进行基于群落组成的层次聚类分析。最后用 R 语言进行 PCA 统计分析和作图。

1.6 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对所得数据进行独立样本 *t* 检验, 显著性水平设为 $P < 0.05$; 实验结果以平均值 \pm 标准误表示。

2 结果

2.1 不同养殖模式下大口黑鲈生长性能和形体指标比较

养殖中期, 流水组的增重率和特定生长率低于静水组, 但是差异不显著 ($P > 0.05$), 流水组成活率高于静水组; 至养殖末期, IPRA 模式中的 2 个流水组之间的生长指标均无显著差异 ($P > 0.05$), 2 个对照组也是无显著差异 ($P > 0.05$), 而流水组增重率和特定生长率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 成活率仍然高于静水组 (表 1)。

2.2 不同养殖模式下大口黑鲈生化指标分析

养殖中期, 流水组肝脏 SOD 和 CAT 活性显著高于静水组 ($P < 0.05$), 流水组 MDA 含量显著低于静水组 ($P < 0.05$); 流水组胃消化酶活性显著高于静水组 ($P < 0.05$); 至养殖末期时, 抗氧化指标和消化酶均不同程度下降, 其中流水组 SOD 仍显著高于静水组 ($P < 0.05$), 流水组 CAT 高于静水组, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 而 MDA 含量显著低于静水组 ($P < 0.05$); 除肠脂肪酶活性显著高于静水组外 ($P < 0.05$), 其他肠胃组织的消化酶活性均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 不同养殖模式下大口黑鲈肠道组织结构比较

肠道组织切片和扫描电镜显示, 养殖末期流水组的大口黑鲈肠道黏膜皱襞完整, 高度较高, 排列紧密, 所形成的皱襞面积较大, 且黏膜褶中上皮细胞排列有序, 表面的纹状缘光滑肠绒毛密而长, 而对照静水组大口黑鲈肠绒毛

表 1 流水组 and 对照静水组大口黑鲈生长性能指标的差异

Tab. 1 Difference of growth indices of *M. salmoides* for treatment and control groups

采样日期 date	处理组 groups	增重率 WGR	特定生长率 SGR	成活率 SR	%
2019-09-01	流水组2 T2	2518.35 \pm 113.22	2.11 \pm 0.032		90.25
	流水组4 T4	2487.54 \pm 115.28	2.04 \pm 0.035		91.14
	静水组1 C1	2600.54 \pm 119.91	2.15 \pm 0.029		85.12
	静水组3 C3	2588.14 \pm 201.52	2.14 \pm 0.031		83.94
2019-12-01	流水组2 T2	3964.28 \pm 267.95 ^a	2.42 \pm 0.044 ^a		88.88
	流水组4 T4	3942.43 \pm 254.88 ^a	2.42 \pm 0.041 ^a		90.12
	静水组1 C1	4436.45 \pm 207.30 ^b	2.49 \pm 0.030 ^b		83.02
	静水组3 C3	4422.56 \pm 256.84 ^b	2.49 \pm 0.038 ^b		82.31

注: 同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: in the same column, values with different small letter superscripts are significantly different ($P < 0.05$), the same below

表 2 流水组和对照静水组大口黑鲈抗氧化酶和消化酶活性的差异

Tab. 2 Difference of antioxidant and digestive enzymes of *M. salmoides* for treatment and control groups

日期 date	组织酶 histenzyme	生化指标 indicators	流水组2 T2	流水组4 T4	静水组1 C1	静水组3 C3
2019-09-01	肝抗氧化酶 liver enzymes	SOD/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	75.23 \pm 5.42 ^a	78.81 \pm 5.42 ^a	65.53 \pm 4.60 ^b	62.35 \pm 4.48 ^b
		CAT/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	23.52 \pm 2.12 ^a	25.64 \pm 2.19 ^a	15.23 \pm 0.91 ^b	14.45 \pm 0.92 ^b
		MDA/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	0.16 \pm 0.01 ^a	0.14 \pm 0.01 ^a	0.19 \pm 0.02 ^b	0.21 \pm 0.02 ^b
	肠消化酶 gut enzymes	LPS/(U/mg)	92.34 \pm 3.62 ^a	95.58 \pm 3.79 ^a	82.63 \pm 3.14 ^b	78.47 \pm 3.02 ^b
		AMS/(U/mg)	21.29 \pm 2.21 ^a	18.94 \pm 2.02 ^a	32.33 \pm 2.49 ^b	33.11 \pm 2.63 ^b
		PTS/(U/mg)	75.57 \pm 5.81 ^a	72.53 \pm 5.32 ^a	45.58 \pm 3.32 ^b	42.11 \pm 3.23 ^b
	胃消化酶 stomach enzymes	LPS/(U/mg)	21.54 \pm 1.91 ^a	23.79 \pm 2.12 ^a	18.73 \pm 1.68 ^b	17.93 \pm 1.59 ^b
		AMS/(U/mg)	8.54 \pm 1.23 ^a	7.92 \pm 1.11 ^a	8.18 \pm 1.21 ^b	8.03 \pm 1.12 ^b
		PTS/(U/mg)	263.23 \pm 8.21 ^a	254.31 \pm 7.82 ^a	232.13 \pm 6.62 ^b	218.89 \pm 6.22 ^b
2019-12-01	肝抗氧化酶 liver enzymes	SOD/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	55.11 \pm 3.91 ^a	58.18 \pm 4.52 ^a	46.57 \pm 3.41 ^b	48.84 \pm 3.62 ^b
		CAT/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	25.88 \pm 2.12	25.57 \pm 2.18	24.23 \pm 1.92	23.51 \pm 1.58
		MDA/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	0.14 \pm 0.01 ^a	0.13 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.02 ^b	0.24 \pm 0.02 ^b
	肠消化酶 gut enzymes	LPS/(U/mg)	42.31 \pm 2.42 ^a	45.67 \pm 2.58 ^a	32.62 \pm 2.13 ^b	38.47 \pm 2.02 ^b
		AMS/(U/mg)	13.21 \pm 1.09	14.92 \pm 1.04	12.22 \pm 1.02	13.08 \pm 1.12
		PTS/(U/mg)	34.61 \pm 2.24	32.41 \pm 5.28	35.58 \pm 1.63	32.12 \pm 1.83
	胃消化酶 stomach enzymes	LPS/(U/mg)	11.32 \pm 0.81	12.79 \pm 1.08	13.73 \pm 1.17	12.92 \pm 1.08
		AMS/(U/mg)	4.42 \pm 0.53	4.88 \pm 0.51	4.22 \pm 0.43	4.01 \pm 0.39
		PTS/(U/mg)	113.79 \pm 5.12	121.23 \pm 5.57	122.42 \pm 5.56	117.81 \pm 5.22

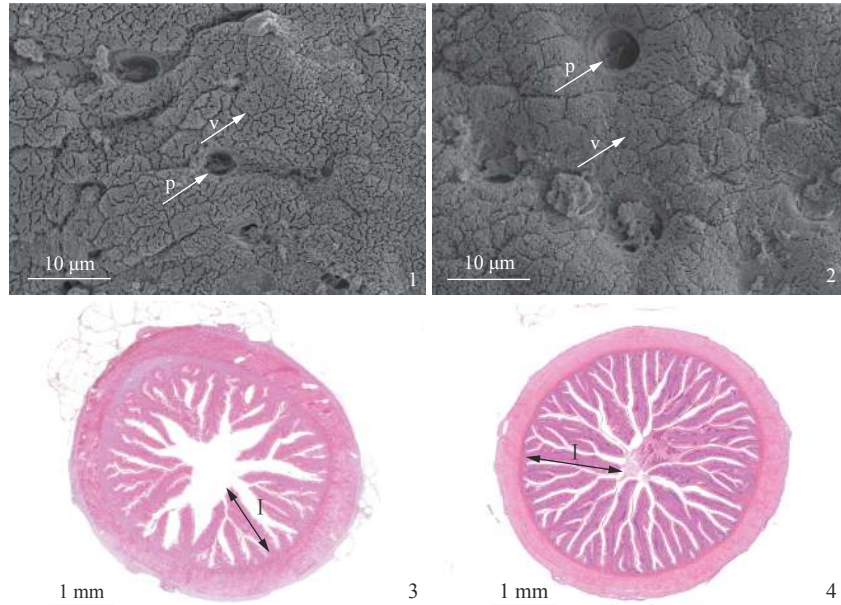
排列疏而短, 出现破损脱落(图版 I); 而透射电镜显示养殖中期时, 运动组肠道上皮细胞微绒毛密而长, 且排列整齐, 呈刷状缘, 分泌有较多的酶原颗粒, 而静水组肠绒毛相对疏而短, 可在一定程度上说明运动促进了肠道酶活(脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶等酶原颗粒)的分泌, 而至养殖末期, 对照组和处理组大口黑鲈均未发现有酶原颗粒分泌(图版 II), 说明肠道消化酶受外界温度、摄食等因素影响较大。

2.4 不同养殖模式下大口黑鲈肠道菌群结构比较

Alpha 多样指数分析 稀释曲线显示了样品中所测得 OTU 数量随着样品序列的增多而变化的情况。结果显示, 随着序列的增加, OUT 数量已趋于一个稳定值, 说明测序数据量合理可靠(图 2)。通过计算在同一样本中检测到的随机选择扩增子序列的覆盖率(Goods coverage)来评估抽样的完整性, Goods coverage 指数反应了

测序的深度, 指数越接近于 1 说明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种, 此研究中各样品覆盖指数均在 0.99(表 3), 表明各样品中的微生物种类几乎都被检测到了。

Alpha 多样指数包含 Chao1、Shannon、Simpson 指数, 前面 2 个指数越大, 最后一个指数越小, 说明样品中的物种越丰富。Alpha 多样性分析结果表明, 养殖中期流水组的胃和肠的 Chao1、Shannon 指数分别显著高于静水组($P<0.05$), 且 Simpson 指数均显著低于静水组($P<0.05$), 表明养殖中期流水养殖使大口黑鲈的肠胃菌群的物种多样性和均匀度明显增高。养殖中期流水组胃 Chao1 和 Shannon 指数均高于养殖水体, Simpson 指数低于养殖水体, 但差异均不显著($P>0.05$); 养殖组中大口黑鲈胃肠的 Chao1 和 Shannon 指数均低于养殖水体, Simpson 指数高于养殖水体, 且存在显著性差异($P<0.05$)。对每个样品进行 OTU 稀释性曲线的分析中, 也发现了相似的规律, 流



图版 I 养殖末期静水组和流水组大口黑鲈肠道扫描电镜和组织切片结构图

1. 静水组肠道扫描电镜, 2. 流水组扫描电镜, 3. 静水组肠道组织切片, 4. 流水组肠道组织切片; v. 肠绒毛表面, p. 分泌孔, I. 肠绒毛

Plate I Gut SEM and H.E of *M. salmoides* for control and treatment groups at the end of the culture period

1. gut SEM of control group, 2. gut SEM of treatment group, 3. gut H.E of control group, 4. gut H.E of treatment group; v. villus surface, p. secretory hole, I. intestinal villus

水组肠胃样品 OTU 数普遍高于养殖水体, 养殖水体高于静水组 (表 3)。

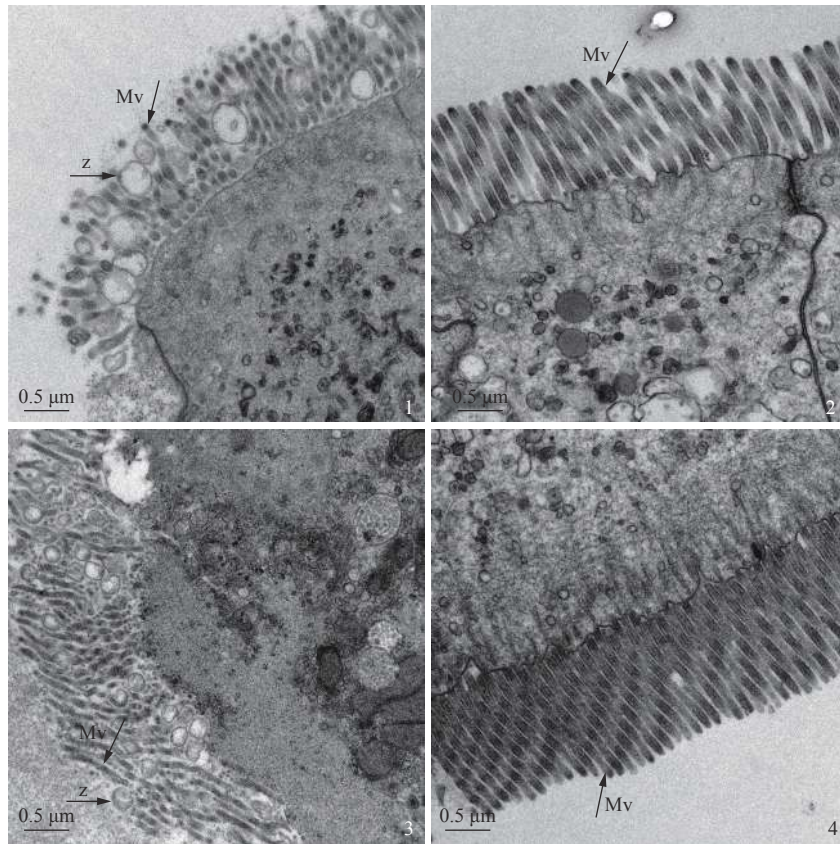
养殖末期时, 流水组的胃 Shannon 多样性和 Simpson 均一度指数均显著低于静水组 ($P < 0.05$), 流水组肠道菌群的 Shannon 和 Simpson 指数和静水组肠道差异不显著 ($P > 0.05$)。流水组的胃 Shannon 指数和 Simpson 指数均随着养殖的进行降低明显, 流水组肠则变化不明显; 静水组的肠胃随着养殖的进行而稍降低, 但差异不显著; 养殖水体随着养殖进行变化不明显。结果表明, 大口黑鲈胃的菌群多样性受运动状态的影响较大。

Beta 多样指数分析 将所有样本中相对丰度小于 1% 的物种归为其他, 图 3 为各样本在门分类水平的细菌群落组成图。在门水平上, 中期静水组胃主要优势菌分别为蓝细菌 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes), 其中蓝细菌门占绝对优势, 其丰度为 $65.09\% \pm 5.43\%$; 流水组胃主要优势菌依次为柔膜菌门 (Tenericutes)、变形菌门、厚壁菌门和蓝细菌门, 其中柔膜菌门则占绝对优势, 丰度为 $63.46\% \pm 12.34\%$; 静水组肠主要优势菌依次为变形菌门、厚壁菌门、蓝细菌门和放线菌门 (Acfinobacteria), 其中变形菌门占绝对优势, 丰

度为 $50.78\% \pm 7.85\%$; 流水组肠主要优势菌分别为厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门, 其中厚壁菌门和变形菌门丰度较高, 分别为 $45.68\% \pm 5.36\%$ 和 $31.85\% \pm 4.20\%$; 而养殖水体主要优势菌依次为厚壁菌门 ($57.44\% \pm 9.20\%$)、变形菌门 ($13.78\% \pm 1.58\%$) 和放线菌门 ($13.40\% \pm 4.82\%$)。结果表明, 养殖中期流水条件显著改变了大口黑鲈肠胃微生物的结构组成, 且胃部微生物组成受养殖水体影响较小。

至养殖后期时, 细菌群落结构分布则发生较大变化, 静水组胃从柔膜菌门 ($60.34\% \pm 7.48\%$) 替代蓝细菌门成为绝对优势菌群, 蓝细菌门相对丰度降低到 $26.70\% \pm 10.86\%$; 流水组胃的绝对优势种也为柔膜菌门, 其相对丰度高达 $83.69\% \pm 13.89\%$; 静水组和流水组肠的优势菌均转变为柔膜菌门 ($61.04\% \pm 6.88\%$, $56.72\% \pm 14.25\%$), 其次是厚壁菌门 ($12.68\% \pm 7.30\%$, $12.97\% \pm 10.01\%$) 和变形菌门 ($12.77\% \pm 5.40\%$, $11.98\% \pm 5.45\%$)。而养殖水体的优势菌分别为变形菌门 ($63.21\% \pm 6.36\%$)、放线菌门 ($19.58\% \pm 2.83\%$) 和厚壁菌门 ($6.73\% \pm 5.77\%$)。结果表明养殖对象肠胃微生物在不同养殖阶段变异较大。

样本间菌群丰度差异分析 在属水平上,



图版 II 静水组和流水组大口黑鲈肠道透射电镜结构图

1. 养殖中期静水组肠道透射电镜, 2. 养殖末期静水组肠道透射电镜, 3. 养殖中期流水组肠道透射电镜, 4. 养殖末期流水组肠道透射电镜; Mv. 微绒毛, z. 酶原颗粒

Plate II Gut TEM of *M. salmoides* for control and treatment groups

1. gut TEM of control group at the middle stage, 2. gut TEM of control group at the end stage, 3. gut TEM of treatment group at the middle stage, 4. gut TEM of treatment group at the end stage; Mv. microvillus surface, z. zymogen granule

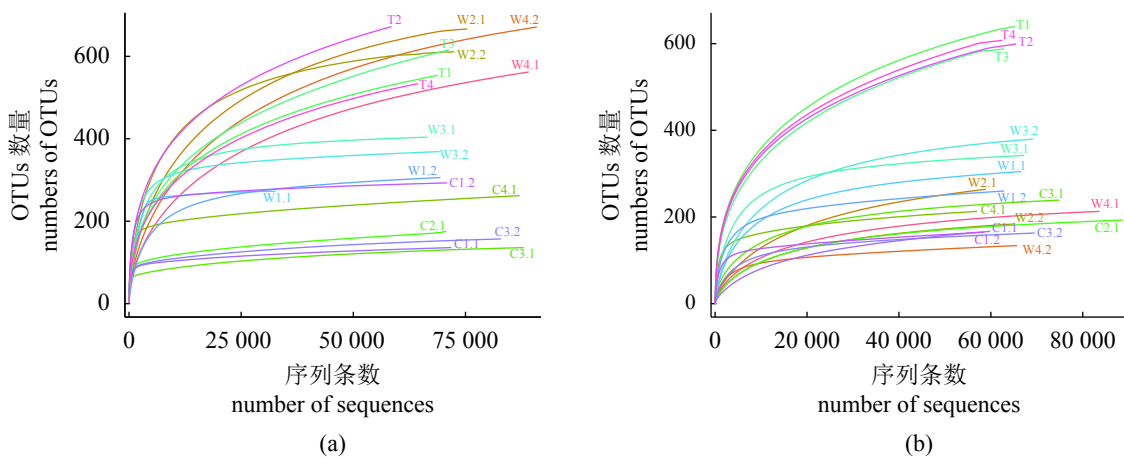


图 2 养殖中期 (a) 和末期 (b) 样品物种丰度的稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction analysis curve of the samples at the middle (a) and end (b) of the culture period

对每个样品鉴定出的细菌分布进行热图统计分析(图 4)。结果显示, 中期时养殖水体的优势菌为微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、*Candidatus_*

Methylobacterium、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、*TM146_norank*, *HgcI_clade* 等; 静水组肠主要优势菌为甲基杆菌属

表 3 流水组和对照静水组样品多样性指数

Tab. 3 Diversity indices of the sample between treatment and control groups

日期 date	样品组 group	OTU	coverage	Chao1	Shannon	Simpson
2019-09-01	流水组胃 T stomach	628.52±43.13	0.99	52 313.15±198.02 ^a	0.79±0.04 ^a	0.13±0.01 ^a
	流水组肠 T gut	181.16±48.62	0.99	11 781.87±70.12 ^b	0.46±0.031 ^b	0.19±0.012 ^b
	槽水体 water	594.02±54.22	0.99	48 983.02±188.22 ^a	0.72±0.045 ^a	0.15±0.011 ^a
	静水组胃 C stomach	338.00±51.40	0.99	234 512.67±119.21 ^c	0.65±0.048 ^c	0.19±0.011 ^b
	静水组肠 C gut	171.50±26.52	0.99	8 795.56±61.11 ^d	0.38±0.028 ^d	0.24±0.014 ^c
2019-12-01	流水组胃 T stomach	203.75±40.62	0.99	10 211.34±67.11	0.32±0.024 ^a	0.26±0.014 ^a
	流水组肠 T gut	210.75±17.91	0.99	10 012.58.65±65.12	0.38±0.032 ^a	0.21±0.015 ^a
	槽水体 water	606.50±23.33	0.99	45 713.18±179.22	0.66±0.041 ^b	0.11±0.0078 ^b
	静水组胃 C stomach	321.75±44.43	0.99	22 541.98±126.13	0.46±0.038 ^c	0.17±0.011 ^c
	静水组肠 C gut	169.00±7.07	0.99	8 561.21±58.08	0.32±0.011 ^a	0.25±0.014 ^a

(*Methylocystis*)、洒水菌属 (*Enhydrobacter Aeromonas*)、不动杆菌属、消化链球菌 (*Peptostreptococcaceae*)、*Enhydrobacter*、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)；流水组肠主要优势菌为芽孢杆菌属 (*Geobacillus*)、*Faecalibacterium*、杆菌属 (*Bacillus*)、*Megamonas* 等；静水组胃主要优势菌为蓝细菌 (*Cyanobacteria_norank*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、*Mitochondria_norank*、柔膜菌属 (*Mollicutes_unclassified*) 等；流水组胃主要优势菌为支原体 (*Mycoplasma*)、分枝杆菌 (*Mycoplasma*)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcaceae_unclassified*)、痤疮丙酸杆菌属等。

末期时养殖水体的优势菌为新鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、MNG7_norank、林杆菌属 (*Alsobacter*) 等；静水组肠主要优势菌为不动杆菌属、戴尔福特菌 (*Delftia*)、链型杆菌属 (*Catenibacterium*) 等，流水组肠主要优势菌为柔膜菌属、消化链球菌属、痤疮丙酸杆菌属等；静水组胃主要优势菌为蓝细菌 (*Cyanobacteria_norank*)、*Mitochondria_norank* 等。

对所有样品菌群进行 PCA 排序 (图 5)，各组内样品聚集较为紧密，说明肠道菌群在每组样品个体之间的差异较小。养殖中期时，第一轴 (PC1) 的解释变异量为 49.67%，第二轴 (PC2) 和第三轴 (PC3) 的解释变异量分别为 23.85% 和 11.41%，3 个轴的累计变异量高达 84.93%；养殖末期时，第一轴 (PC1) 的解释变异量为 45.89%，第二轴

(PC2) 和第三轴 (PC3) 的解释变异量分别为 25.34% 和 12.42%，3 个轴的累计变异量高达 83.65%。

对所有样品菌群在组内个体间进行基于 Bray-curits 距离的差异分析 (图 6)。结果表明中期时，养殖组和流水组胃存在显著差异，且和流水组及养殖组肠以及养殖水体均存在显著性差异 ($P < 0.05$)；而流水组肠胃及养殖水体间差异不显著 ($P > 0.05$)。至养殖末期时，养殖组和流水组肠胃之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)，和养殖水体之间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 IPRA 模式对大口黑鲈生长性能的影响

水流是鱼类生活环境中的重要生态因子，一定的水流条件会促进鱼类游泳运动，增强活动代谢，改善其生理功能，影响鱼类的摄食、生长和鱼体营养组成^[18]。运动对鱼体形态指标的影响主要与脂肪的沉积有关，相关研究表明当运动速度在一定强度范围内可以增加鱼体脂肪的沉积，其直接结果是导致肥满度、脏体指数和肝体指数会出现一定程度的上升^[19]，但超过一定范围强度的运动会直接导致脂肪分解供能而造成肥满度等指标出现下降^[20-21]，并对鱼体生长、免疫和代谢带来重要影响。Young 等^[22]对条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*) 在不同流速下的生长研究发现，与没有运动训练的相比，经过 1.2~2.4 bl/s 流速的逆流运动训练，条纹狼鲈的增重率和特定

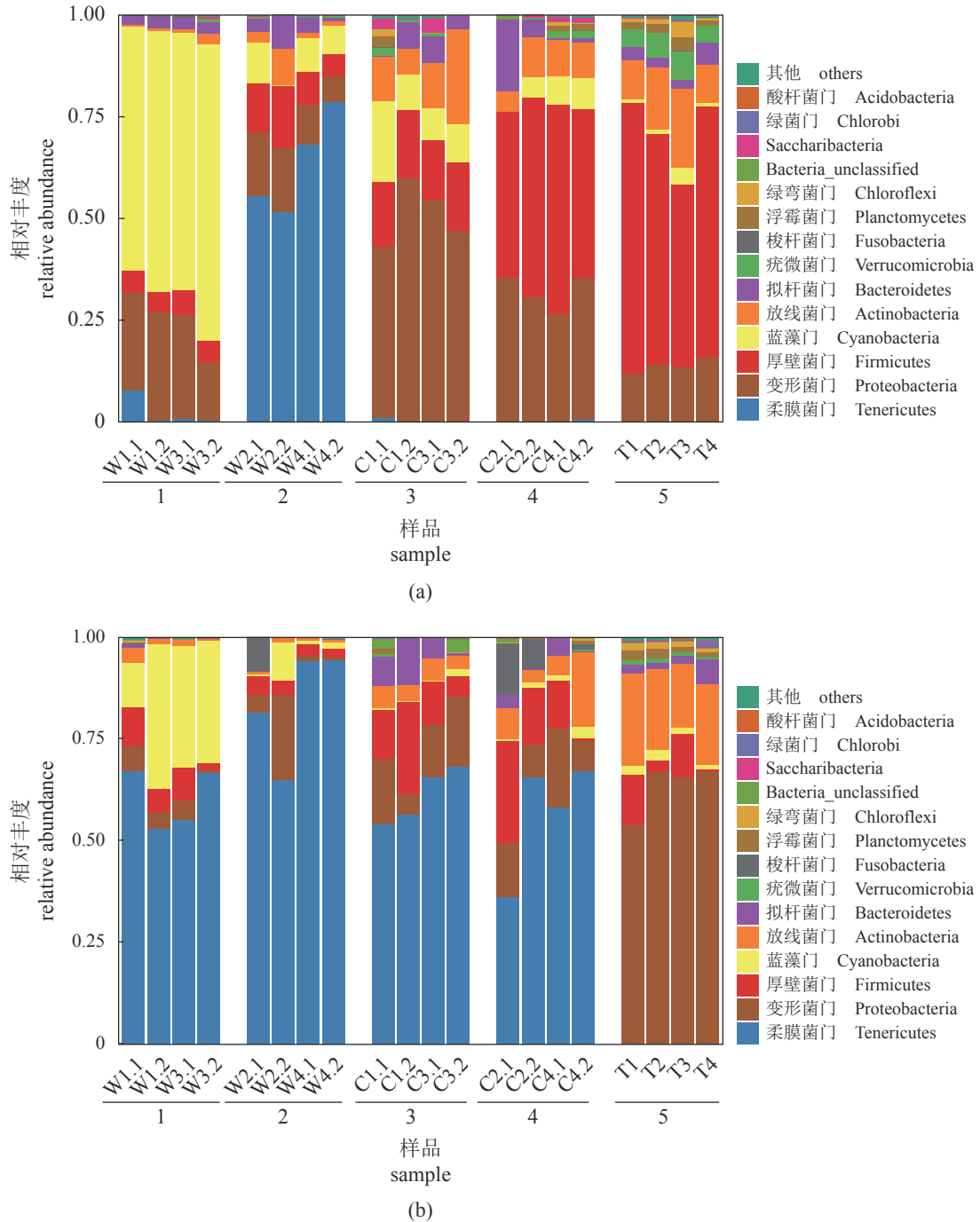


图 3 养殖中期 (a) 和末期 (b) 消化道微生物在门水平相对丰度比较

1. 静水组胃, 2. 流水组胃, 3. 静水组肠, 4. 流水组肠, 5. 养殖水体; 下同

Fig. 3 Relative abundance at the phylum level at the middle (a) and end (b) of the culture period

1. stomachs of control groups (control.W), 2. stomachs of treatment groups (treatment.W), 3. guts of control groups (control.C), 4. guts of treatment groups (treatment.C), 5. aquaculture water (water); the same below

生长率都有所增加, 而超过 2.4 bl/s, 则增重率和特定生长率会降低; 溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 在 4 个流速 (0、0.85、1.72 和 2.50 bl/s) 下持续训练 20 d 后, 0.85 bl/s 流速组的溪红点鲑具有最高

的特定生长率和增重率, 而 2.50 bl/s 流速组的生长则受到抑制^[23]。本研究中, 流水组增重率、特定生长率和肥满度随着养殖进行均不同程度低于静水组, 至养殖末期时, 差异达到显著性水

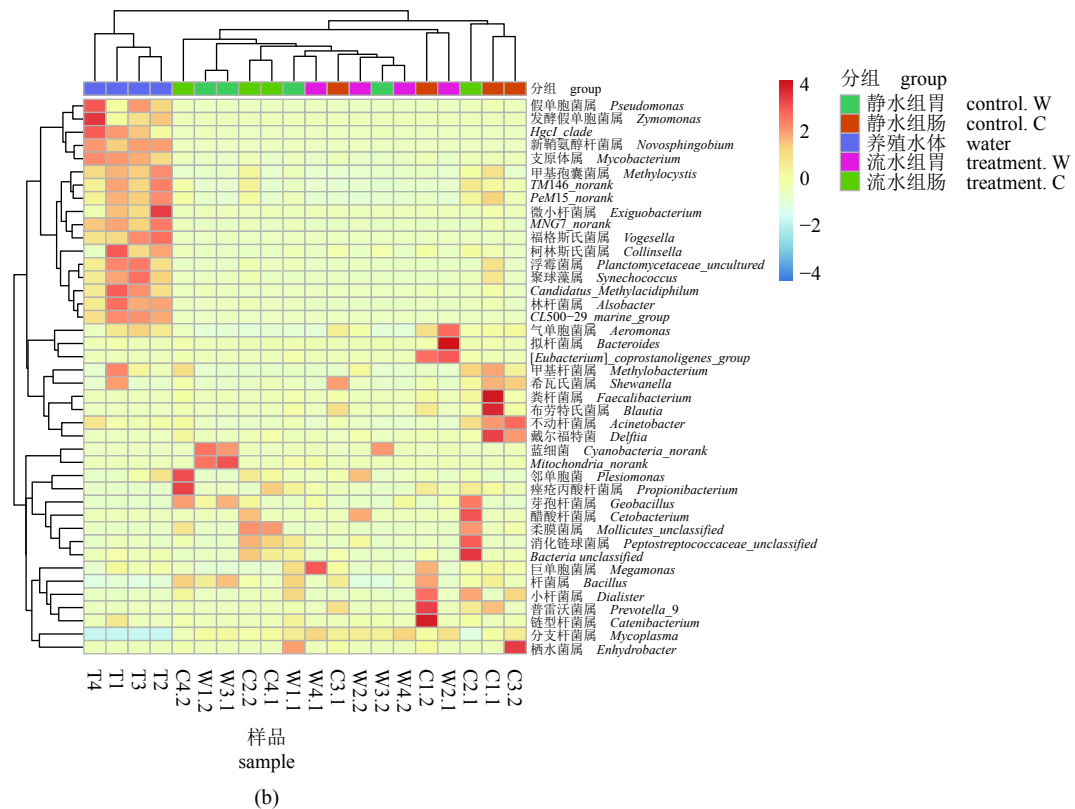
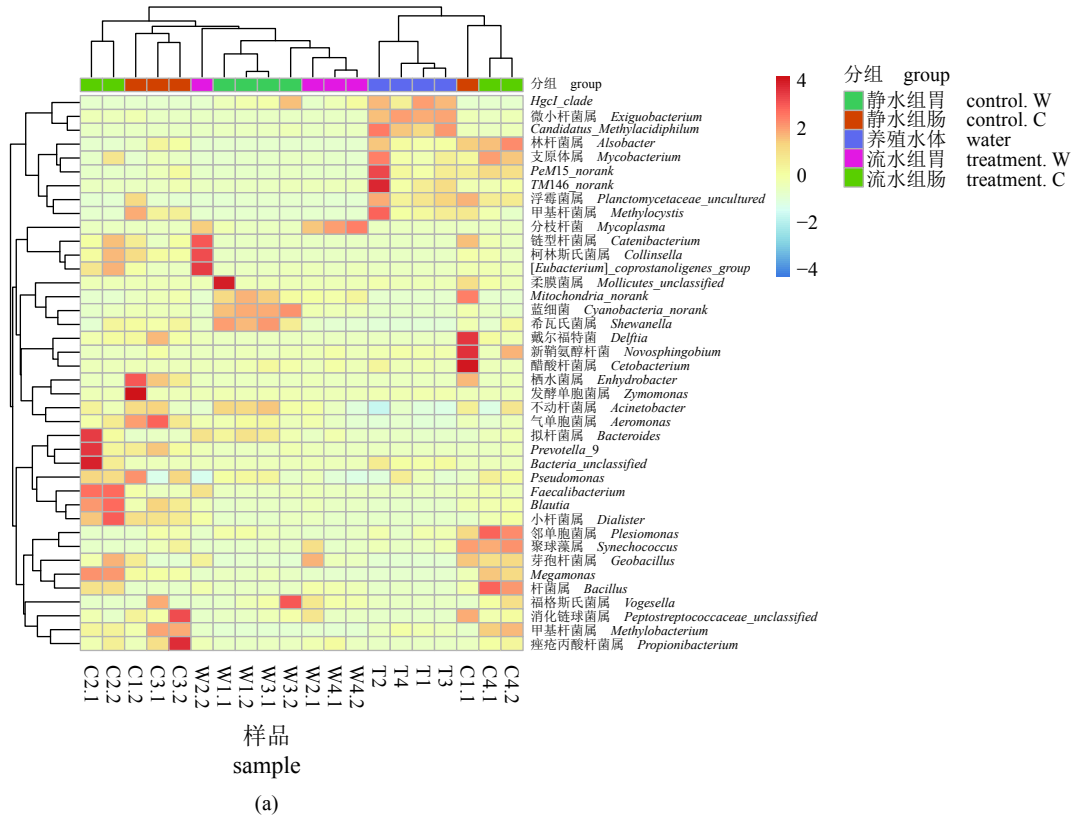


图 4 养殖中期 (a) 和末期 (b) 属分类水平多样本热图

Fig. 4 Microbial community heatmap at the genus level of the middle (a) and end (b) during the culture period

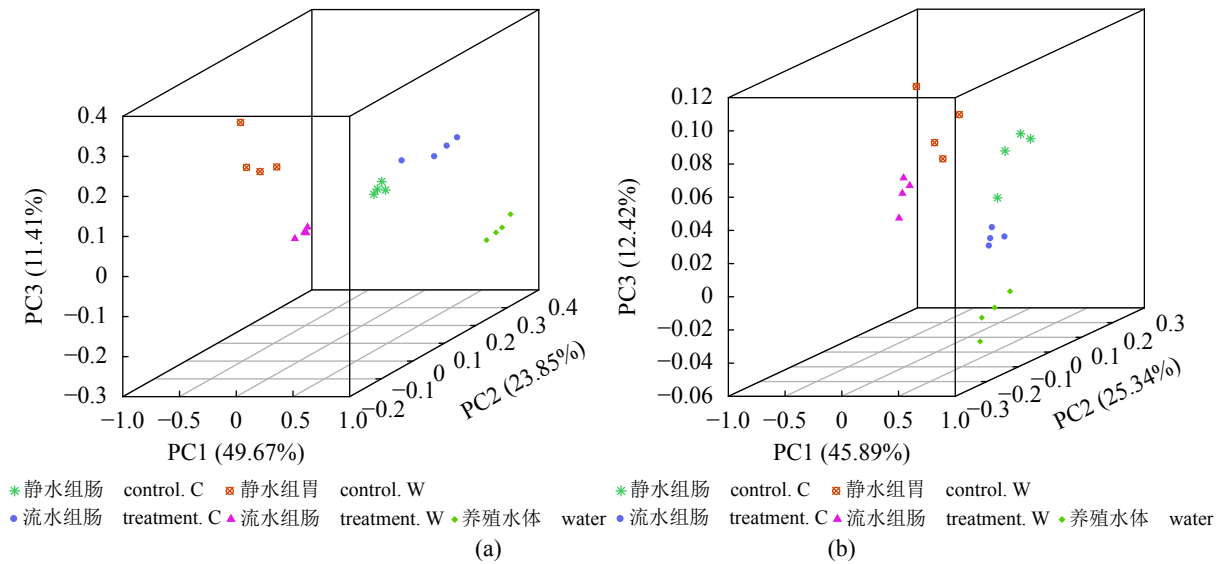


图 5 养殖中期 (a) 和末期 (b) 样品 PCA 排序图
Fig. 5 PCA diagram of samples in the middle (a) and end (b) of culture period

平,说明当前流水槽前端0.5 m/s的流速条件下,大口黑鲈通过分解脂肪给机体运动提供能量,有效抑制了大口黑鲈内脏脂肪的沉积,这一结果与原居林等^[8]研究结果一致。另外,成活率显著提高主要与IPRA养殖系统中敌害生物少、环境因子更佳适宜于存活有关,这一结果与刘梅等^[9]研究IPRA能提高黄颡鱼成活率阐述相一致。

3.2 IPRA 模式对大口黑鲈生化指标的影响

众所周知,高密度养殖会导致鱼体免疫能力下降,疾病暴发频率增大。鱼类属于进化程度较低的变温动物,非特异性免疫系统是抵抗疾病感染的最主要手段,已有研究表明适宜运动能提高鱼体非特异性免疫能力^[24]。SOD、CAT和MDA均为广泛存在鱼类体内,为清除氧自由基的重要抗防御性功能酶^[25],可在一定程度上反映鱼类在不同环境条件下的健康状况,可作为衡量鱼类对外界环境适宜程度的重要生理指标^[26-27]。本研究中,养殖中期流水组肝脏SOD和CAT抗氧化酶活性显著高于静水组,流水组CAT显著低于静水组,主要是水流刺激了大口黑鲈持续游泳运动,需要氧化分解额外脂肪供能而导致肝脏中积累了过量的活性氧,通过启动较强的抗氧化酶系统,清除活性氧的损伤,以保持细胞免受伤害,从而维护细胞的正常结构和功能。这一结果表明,合适的运动状态提高了机体的非特异性免疫能力,有助于降低肝脏脂肪氧化,进而保护肝脏健康,增强大口黑

鲈抗病能力,提高其成活率,这和宋波澜等^[26]在研究西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)CAT、SOD和MDA活力随着流速的增加而显著增强,2个流速组(1.0、2.0 bl/s)均显著大于静水组,2.0 bl/s组流速下活力最高的结果相一致。而至养殖末期,3种酶仍显著高于对照组,保持在较高水平,说明大口黑鲈已经适应了水流刺激的影响。

消化酶活性是消化能力的一个重要指标,它能够直接反映鱼类的营养状况,与鱼类的生长密切相关^[27-28]。鱼类游泳运动的能量来自于营养物质(糖类、脂类、淀粉、蛋白质等)的氧化分解,因此鱼类的运动能力与其代谢所需消化酶分泌量密切相关。比如一些大洋性鱼类,其运动能力强,游泳迅速而持久,需要的能量供应较多,因此消化酶(主要是蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶)较多;中等活跃程度的鱼类消化酶含量适中;而一些底栖鱼类的蛋白酶和淀粉酶活性含量较低^[29]。不过,关于游泳运动强度对鱼类消化酶活性的影响研究报道还较少^[30],宋波澜^[31]研究结果发现,有氧运动训练显著提高了中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)幼鱼肝胰脏和肠道中蛋白酶和脂肪酶活性,这与本研究结果较一致,即养殖中期流水组肠胃消化酶活性显著高于养殖组,说明养殖中期时,温度适宜,大口黑鲈处于快速生长期,且处于持续运动状态,增强了胃肠道中消化酶的分泌和活性,另一方面改变肠道组织结构,即流水组肠绒毛长而密,

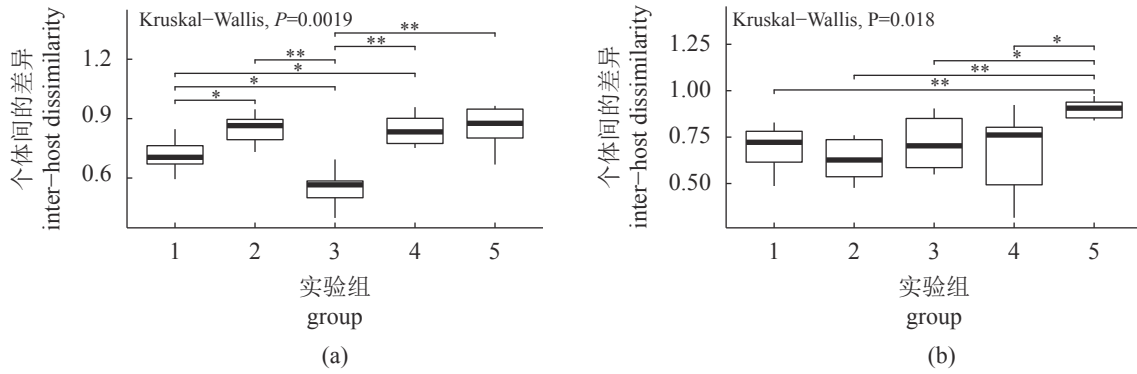


图6 养殖中期(a)和末期(b)样品个体间差异比较

Fig. 6 Comparison of Bray-curits dissimilarities between individuals at the middle (a) and end (b) of the culture period

增大吸收面积, 提高对食物的消化效率, 以维持生长和运动。而养殖末期消化酶均不同程度下降, 主要是由于此时温度较低, 大口黑鲈不摄食, 生长停滞, 因此消化酶活性也会不同程度下降, 但仍高于养殖组。相关研究也已证实温度和摄食状态会影响消化酶活性, 如韩京成等^[32]研究证实鲫 (*Carassius auratus*) 肠道中蛋白酶和脂肪酶活性在 9~25 °C 范围内均随着温度的下降而下降; 再如鱼类摄食会引起消化酶活性的变化, 食物能刺激消化酶的分泌^[15]。

3.3 IPRA 模式对大口黑鲈肠道群落结构的影响

微生物群落的多样性在维持生态功能方面有重要的作用, 多样性降低表明微生物群落功能稳定性变差, 生物患病风险增大^[33]。Li 等^[15]和李东亮^[34]研究发现发病塘养殖对象的肠道细菌多样性低于健康塘, 表明微生物的多样性在养殖类动物中有重要的调节作用。朱文根等^[33]研究结果显示, 感染呼肠孤病毒组的肠道菌群的 Alpha 多样性指数显著低于对照组, 表明患病草鱼肠道菌群失去原有平衡而变得紊乱。本研究中养殖中期流水组肠胃样品 OTU 数普遍高于养殖水体和静水组, 其物种多样性和均匀度指数显著高于静水组, 说明持续的运动游泳状态显著增加了肠胃菌群多样性, 有效地改善肠道微生态区系的平衡, 增强了大口黑鲈抗病能力, 其原因可能是运动能有效地促进大肠绒毛的生长, 扩大了大肠黏膜表面积, 利于微生物的定殖, 增强对营养物质的吸收利用^[34], 并调节机体分泌免疫酶^[27]。而到了养殖末期, 流水组的胃肠微生物群落均不同程度降低, 其中胃部微生物

显著低于养殖组, 说明运动对消化道微生物菌群多样性影响程度会由于生长阶段不同而差异较大。在哺乳动物的研究表明肠道菌群可塑性较强, 适当运动易使肠道菌群发生改变, 促进有益菌群发展, 增加肠道菌群多样性的以及减少致病菌群, 能有效降低患各种疾病的风险^[35]。本研究结果说明养殖中期流水组大口黑鲈消化道微生物丰富, 消化吸收能力强, 抗病能力较大, 而至养殖后期, 流水组中大口黑鲈肠胃菌群功能稳定性变差, 暴发疾病的风险增大, 此阶段应时刻关注 IPRA 系统中养殖对象的健康状态, 加强养殖管理, 确保养殖成功。

研究表明, 食物组成^[36]、环境因素^[37]、肠道分化程度(即不同生长阶段)^[38]和遗传因素^[39]等均可影响肠道菌群的结构和数量, 进而影响机体的营养代谢、免疫调控和生长发育。Hansen 等^[40]研究发现, 不同养殖环境条件下的大西洋鲱 (*Clupea harengus*), 其肠道内菌群的组成不同; Nedoluha 等^[41]也发现, 不同养殖方式下条纹鲈肠道菌群存在差异; 但是目前关于运动对鱼类消化道菌群的影响报道较为匮乏。本研究中中期流水组和静水组肠胃的优势菌完全不同, 说明持续的运动状态改变了消化道的菌群结构, 其中静水组肠主要优势菌门为变形菌门 (50.78±7.85%); 优势菌属为甲基杆菌属、希瓦氏菌属, 而流水组肠主要优势菌门为厚壁菌门 (45.68%±5.36%), 其优势菌属分别为芽孢杆菌属、杆菌属 (*Bacillus*)、甲基杆菌属。研究表明, 变形菌门在稳定(健康)肠道菌群中占比较高^[16], 而厚壁菌门尤其是芽孢杆菌属是消化食物残余代谢的主要细菌^[42], 能促进消化, 提高营养吸收效率, 同时也是一

类重要的防治病害的微生物,其能产生抗菌蛋白质或酶等抗菌物质诱导宿主的抗病能力^[38]。因此,养殖中期可认为水流刺激引起大口黑鲈的运动状态利于有益菌在肠道内定殖,改善肠道微生态,维持肠道健康。但是至养殖末期这一生长阶段,流水组和静水组肠胃的优势门转变为柔膜菌门,推测不同生长阶段流水运动对肠道产生的影响不同,即养殖中期(生长期)运动有利于肠道有益微生物定殖,而养殖末期(越冬期)流水运动的这种改善作用不明显,而过量的运动甚至可能会引发肠道感染,从而影响鱼体健康。因此,越冬期应考虑优化推水时间,减轻水流刺激对越冬期大口黑鲈的不利影响。

此外,本研究中,中期和末期的肠胃均和养殖水体微生物菌落组成相似性较小,这与相关研究结果较一致,如斑点叉尾鲷^[43](*Ictalurus punctatus*)及斑马鱼^[44](*Danio rerio*)不同发育阶段肠道菌群的研究结果证实在发育阶段的初期,肠道菌群的组成与养殖环境较为一致,而随着年龄的增加,肠道菌群结构更为复杂,个体之间的差异也逐渐增大。本研究结果表明养殖水环境对肠胃菌群影响较小,特别是养殖末期,养殖水体优势菌属是杆菌属,水环境中有益微生物含量丰富,而此阶段肠胃的优势菌为柔膜菌门中的支原体属,很多研究表明支原体属中的运动支原体和类支原体分别是鱼类和虾类的致病病原,且主要寄生于肠道的绒毛上皮细胞内,造成消化机能障碍^[45]。主要原因可能是由于大口黑鲈属于热带性水生动物,其最适生长水温为25℃,而湖州地区养殖末期气温低,处于越冬期基本不摄食,即使养殖水环境较优条件下,大口黑鲈机体仍处于一个低温胁迫应激状态。因此,在养殖末期,大口黑鲈达到上市规格后,可以考虑及时出售,减少发病风险。

4 结论

综上所述,不同生长阶段IPRA模式下的流水养殖对大口黑鲈生长性能、免疫能力、消化能力及肠胃菌群的影响存在较大差异。养殖中期,IPRA模式可以有效促进大口黑鲈生长、增强其免疫力,促进肠绒毛发育,提高消化酶活性,提高菌群多样性,改善肠胃菌群结构,促进肠道微生态平衡,进而改善机体健康,而这

种改善效果至养殖末期则变得不明显,且持续的运动状态会引起鱼类肠道菌群多样性降低,引起菌群失衡,造成机体应激胁迫。本研究表明养殖末期,IPRA应优化推水速度及时间,及时捕售以降低养殖密度,同时加强养殖管理,避免疾病大规模暴发。

参考文献 (References):

- [1] 宋波澜,林小涛,许忠能.逆流运动训练对多鳞四须鲃巴摄食、生长和体营养成分的影响[J].水产学报,2012,36(1):106-114.
Song B L, Lin X T, Xu Z N. Effects of upstream exercise training on feeding efficiency, growth and nutritional components of juvenile tinfoil barb(*Barbodes schwanenfeldi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 106-114(in Chinese).
- [2] Brown T W, Chappell J A, Boyd C E, et al. A commercial-scale, in-pond raceway system for *Ictalurid* catfish production[J]. *Aquacultural Engineering*, 2011, 44(3): 72-79.
- [3] Brown T W, Hanson T R, Chappell J A, et al. Economic feasibility of an In-Pond raceway system for commercial catfish production in West Alabama[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2014, 76(1): 79-89.
- [4] 马文君,丁雪燕,周凡,等.浙江省池塘内循环流水"跑道"养殖模式发展现状及建议[J].*中国渔业经济*, 2019, 37(5): 76-81.
Ma W J, Ding X Y, Zhou F, et al. Development status and countermeasures of in-pond raceway aquaculture in Zhejiang Province[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2019, 37(5): 76-81(in Chinese).
- [5] 王浩伟.草鱼池塘循环水养殖系统生态及经济效益分析与评价[D].南京:南京农业大学,2015.
Wang H W. Ecological and economic analysis and evaluation of grass carp pond recirculating aquaculture system[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [6] 邹礼根,郭水荣,翁丽萍,等.两种不同养殖模式对青鱼肌肉营养品质的影响[J].*宁波大学学报(理工版)*, 2018, 31(4): 25-30.
Zou L G, Guo S R, Weng L P, et al. Effects of two different culture modes on muscle nutrients of black carp[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Engineering Edition), 2018, 31(4): 25-30(in Chinese).
- [7] 王力, 郭水荣, 徐铃威, 等. 池塘内循环流水养殖七星鲈和斑点叉尾鮰实例[J]. *水产养殖*, 2018, 39(3): 4-6.
Wang L, Guo S R, Xu L W, *et al.* Circulating water in the pond breeding of seven star perch and speckled fork[J]. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(3): 4-6(in Chinese).
- [8] 原居林, 刘梅, 倪蒙, 等. 不同养殖模式对大口黑鲈生长性能、形体指标和肌肉营养成分影响研究[J]. *江西农业大学学报*, 2018, 40(6): 1276-1285.
Yuan J L, Liu M, Ni M, *et al.* Effects of different culture models on growth performances, morphological traits and nutritional quality in muscles of *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2018, 40(6): 1276-1285(in Chinese).
- [9] 刘梅, 宓国强, 原居林, 等. 池塘内循环流水养殖模式对黄颡鱼生长性能、形体指标、血清生化指标及肌肉营养成分的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(4): 1704-1717.
Liu M, Mi G Q, Yuan J L, *et al.* Effects of internal circulation pond aquaculture model on growth performance, morphological indices, serum biochemical indices and muscle nutritional components of *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(4): 1704-1717(in Chinese).
- [10] 阴晴朗, 王志芳, 郭忠宝, 等. 池塘循环水槽一年两造养殖吉富罗非鱼的经济和生态效益分析[J]. *南方水产科学*, 2019, 15(6): 25-33.
Yin Q L, Wang Z F, Guo Z B, *et al.* Economic and ecological benefits of annually two-cycle farming method of Gift tilapia with in-pond raceway system[J]. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(6): 25-33(in Chinese).
- [11] 王裕玉, 徐跑, 聂志娟, 等. 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈生长性能和生理指标的影响[J]. *淡水渔业*, 2019, 49(3): 90-95.
Wang Y Y, Xu P, Nie Z J, *et al.* Growth performance and serum biochemical parameters of juvenile large-mouth bass (*Micropterus salmoides*) reared at different stocking densities in an in-pond raceway recirculating culture system[J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(3): 90-95(in Chinese).
- [12] 张雷鸣, 原居林, 倪蒙, 等. 两种池塘养殖模式水质因子和浮游植物群落比较分析[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(2): 317-326.
Zhang L M, Yuan J L, Ni M, *et al.* Comparative analysis of water quality factors and phytoplankton communities in two different aquaculture models[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(2): 317-326(in Chinese).
- [13] Ni J J, Yan Q Y, Yu Y H, *et al.* Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2014, 87(3): 704-714.
- [14] Li T T, Li H, Gatesoupe F J, *et al.* Bacterial signatures of "red-operculum" disease in the gut of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(3): 510-521.
- [15] Li X H, Zhou L, Yu Y H, *et al.* Composition of gut microbiota in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) varies with host development[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(1): 239-249.
- [16] 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.
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(in Chinese).
- [17] Allen J M, Miller M E B, Pence B D, *et al.* Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2015, 118(8): 1059-1066.
- [18] 李秀明. 运动训练对中华倒刺鲃幼鱼生长的影响及其机理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
Li X M. The effect and mechanism of exercise training on growth performance in juvenile *Spinibarbus sinensis*[D]. Chongqing: Southwest University, 2013 (in Chinese).
- [19] Merino G E, Piedrahita R H, Conklin D E. Effect of water velocity on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2007, 271(1-4): 206-215.
- [20] Liu G Y, Wu Y J, Qin X H, *et al.* The effect of aerobic exercise training on growth performance, innate immune response and disease resistance in juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Aquaculture*, 2018, 486: 18-25.

- [21] Yogata H, Oku H. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail[J]. *Fisheries Science*, 2010, 66(6): 1100-1105.
- [22] Young P S, Cech Jr J J. Improved growth, swimming performance, and muscular development in exercise-conditioned young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*)[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, 50(4): 703-707.
- [23] East P, Magnan P. The effect of locomotor activity on the growth of brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1987, 65(4): 843-846.
- [24] Castro V, Grisdale-Helland B, Helland S J, et al. Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2011, 160(2): 278-290.
- [25] 郭黎, 马爱军, 王新安, 等. 盐度和温度对大菱鲂幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 422-428.
- Guo L, Ma A J, Wang X A, et al. Effects of temperature and salinity on the activities of antioxidant enzymes of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2012, 27(5): 422-428(in Chinese).
- [26] 宋波澜, 许忠能, 王占全. 流速对西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)行为特性, 抗氧化酶及体内盐酸恩诺沙星残留的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(5): 1109-1114.
- Song B L, Xu Z N, Wang Z Q. Effect of water velocity on behavior, antioxidant enzyme and residues of enrofloxacin-HCl in siberian sturgeon(*Acipenser baerii*)[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(5): 1109-1114(in Chinese).
- [27] 王国霞, 陈冰, 孙育平, 等. 脱脂亮斑扁角水虻幼虫粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、营养素沉积率、血清生化指标和消化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2020, 44: 987-998.
- [28] Jørgensen E H, Jobling M. The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. *Aquaculture*, 1993, 116(2-3): 233-246.
- [29] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 第2版. 广州: 广东高等教育出版社, 2007.
- Lin H R. *Physiology of Fish*[M]. 2nd ed. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2007 (in Chinese).
- [30] Palstra A P, Planas J V. Fish under exercise[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(2): 259-272.
- [31] 宋波澜. 水流因子对红鳍银鲫 (*Barbodes schwanenfeldi*) 游泳行为、生长和生理生态影响的研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2008.
- Song B L. Effects of water current on swimming activity, growth and ecophysiological aspect of young *Barbodes schwanenfeldi*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2008 (in Chinese).
- [32] 韩京成, 刘国勇, 梅朋森, 等. 温度对鲫血液生化指标和消化酶的影响[J]. *水生态学杂志*, 2010, 31(1): 87-92.
- Han J C, Liu G Y, Mei P S, et al. Effects of temperature on the hematological indices and digestive enzyme activities of crucian carp(*Carassius auratus*)[J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, 31(1): 87-92.
- [33] 朱文根, 李星浩, 饶刘瑜, 等. 感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(1): 109-116.
- Zhu W G, Li X H, Rao L Y, et al. Effects of reovirus infection on the intestinal microbiota diversity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(1): 109-116(in Chinese).
- [34] 李东亮. 感染嗜水气单胞菌草鱼肠道菌群结构研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- Li D L. Study of the intestinal flora structure of grass carp infection with *Aeromonas hydrophila*[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [35] Cronin O, Barton W, Skuse P, et al. A Prospective metagenomic and metabolomic analysis of the impact of exercise and/or whey protein supplementation on the gut microbiome of sedentary adults[J]. *Msystems*, 2018, 3(3): e00044-18.
- [36] 靳雅琦, 郁二蒙, 张凯, 等. 三种饵料对草鱼血清酶活性和肠道组织结构及细菌菌群的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(9): 1652-1663.
- Jin Y Q, Yu E M, Zhang K et al. Effects of three feeds on serum enzyme activity, intestinal structure and bacterial flora of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(9): 1652-1663(in Chinese).

- [37] Candela M, Biagi E, Maccaferri S, *et al.* Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(8): 385-391.
- [38] Karl J P, Lee M M, Madslie E H, *et al.* Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 312(6): 559-571.
- [39] Benson A K, Kelly S A, Legge R, *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933-18938.
- [40] Hansen G H, Strøm E, Olafsen J A. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(2): 461-470.
- [41] Nedoluha P C, Westhoff D. Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems[J]. *Food Microbiology*, 1997, 14(3): 255-264.
- [42] 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.
- [43] Bledsoe J W, Peterson B C, Swanson K S, *et al.* Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S *rRNA* gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166379.
- [44] Stephens W Z, Burns A R, Stagaman K, *et al.* The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 644-654.
- [45] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- Fang H, Chen C Z, Zhang X J. Aquacultural animal pathogenic bacteriology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009 (in Chinese).

Effects of inner-pond raceway aquaculture on the growth performance, antioxidant enzymes, digestive enzymes, digestive tract structure, and bacterial flora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

LIU Mei, LIAN Qingping, NI Meng, GUO Aihuan, YUAN Julin*

(Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Aquaculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: The aim of this paper is to investigate the effects of inner-pond raceway aquaculture (IPRA) on the growth performance, antioxidant enzymes, digestive enzymes, digestive tract structure, and bacterial flora of *Micropterus salmoides*. There were four tanks in a pond with a recirculating flowing water culture, two of them were set up as the treatment group with flowing water, and the other two were set up as the control group with still water. The experiment lasted for 153 days. Relevant growth, biochemical indicators, and histomorphological structures were measured at the midway and the end of the culture period, and the microorganisms in the digestive tract were analyzed using the Illumina Miseq sequencing platform. Results showed that, ① Halfway through the culture period, the weight gain rate, specific growth rate, and condition factor of the treated group were lower than those of the control group. At the end of the culture period, the weight gain rate, specific growth rate, and condition factor of the treated group continued to decrease, although the treatment group's survival rate was always higher than that of the control group. ② Halfway through the culture period, liver SOD and CAT in the treated group were significantly higher than those in the control group. MDA (0.16 ± 0.01 , 0.14 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) in the treatment group was significantly lower than that in the control group (0.19 ± 0.02 , 0.21 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{mg}$), while digestive enzyme activity in the treatment group was significantly higher than that in the control group. By the end of the culture, antioxidant enzymes and digestive enzyme activity were declining to some extent, while SOD (55.11 ± 3.91 , 58.18 ± 4.52 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) in the treated group were still obviously higher than those (46.57 ± 3.41 , 48.84 ± 3.62 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) in the control group. ③ The height and density of intestinal villus in the treated group were significantly higher than those in the control group, and more digestive enzymes were secreted midway through the culture, which strengthened the digestive and absorptive functions of the intestine. ④ Halfway through the culture, there was a significant increase in the species diversity and evenness of the gastrointestinal flora of the *M. salmoides* in flowing water. However, by the end of the culture, the gastrointestinal diversity and evenness indices of the treated group were decreasing. In addition, midway through the culture, the stomachs of the treated group and the control group contained Helotiales and Cyanobacteria. The dominant bacteria found in the stomachs of the treatment group and control group were Proteobacteria and Firmicutes respectively, while the dominant bacteria found in the intestines of the control group were Firmicutes and then Proteobacteria. Towards the later stages of culture, the dominant bacteria found in the stomachs and intestines of both the treatment group and control group were Helotiales, while the dominant bacteria present in the culture water were Proteobacteria and Actinobacteria. The present study shows that continuous movement of water under IPRA can reduce the growth indexes.

Key words: *Micropterus salmoides*; inner-pond raceway aquaculture; growth performance; antioxidant enzymes; digestive enzymes; histomorphology; structure of bacterial flora

Corresponding author: YUAN Julin. E-mail: Yuanjulin1982@126.com

Funding projects: Key Research and Development Program of China (2020YFD0900105); Public Welfare Key Applied Research Project of Huzhou (2019GZ17); Collaborative Agricultural Major Extension Project of Zhejiang Province (2020XTTGSC01); Huzhou Rural Revitalization Special Project of Huzhou City (2018ZD2025); Scientific Research Institutes Support Special Project of Zhejiang Province (2021YSZX006)