

DOI: 10.12264/JFSC2020-0148

## 池塘和稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群、免疫酶活性及肌肉氨基酸比较分析

赵柳兰<sup>1</sup>, 龙亚男<sup>1</sup>, 罗杰<sup>1</sup>, 刘巧<sup>1</sup>, 周剑<sup>2</sup>, 杜军<sup>2</sup>, 周亚<sup>3</sup>, 杨佰维<sup>4</sup>, 杨淞<sup>1</sup>

1. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130;
2. 四川省农业科学院水产研究所, 四川 成都 611731;
3. 重庆三峡职业学院, 重庆 404155;
4. 四川省长吻鲩原种场, 四川 成都 611247

**摘要:** 为了综合评价稻田和池塘两种养殖模式下建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)的肠道健康及肌肉风味, 在夏秋两季对这两种养殖模式下建鲤的肠道菌群、肠道免疫酶活性及肌肉氨基酸含量进行比较分析。结果显示, 与养殖模式相比较, 建鲤肠道菌群受季节的影响更显著。夏秋两季两种模式下建鲤肠道的优势菌群为厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌门(Proteobacteria), 且池塘模式下秋季肠道菌群多样性显著高于夏季( $P<0.05$ )。建鲤肠道免疫酶活性夏季比秋季显著降低( $P<0.05$ ), 其中夏季和秋季池塘的碱性磷酸酶(AKP)活性显著高于稻田模式( $P<0.05$ )。建鲤肌肉中共检测出 18 种游离氨基酸, 其中肌肉中天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、组氨酸及苯丙氨酸的含量在稻田模式显著高于池塘模式( $P<0.05$ ), 且鲜、甜及苦 3 种呈味氨基酸总体含量均高于池塘模式( $P<0.05$ )。综上所述, 与池塘养殖建鲤相比, 稻田养殖的建鲤肠道菌群更稳定, 肌肉具有更强烈的呈味特性。

**关键词:** 建鲤; 稻田养殖; 池塘养殖; 肠道菌群; 免疫酶活; 氨基酸

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)01-0048-09

稻渔共生互促系统是一种现代生态循环农业发展新模式, 可改善稻田生物群落, 有效提高稻田的综合生产能力<sup>[1]</sup>。建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)含肉量高, 肉质鲜美, 深受消费者欢迎, 是我国淡水养殖的主要经济鱼类之一, 具有生长速度快、适合多种养殖方式饲养、易起捕等优点, 在稻田养殖模式下具有明显的生长优势<sup>[2]</sup>。

肠道菌群在平衡消化、免疫反应和调节宿主生理机能方面对宿主至关重要<sup>[3-4]</sup>。肠道微生物群落的稳定性是宿主抵抗病原体的关键, 失衡则会导致宿主生理活动的紊乱, 引发疾病, 其受到水温、季节、水质等环境因素的影响<sup>[5-6]</sup>。在对稻田和池塘养殖模式的研究中发现, 养殖模式的不同

会改变大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)肠道菌群的丰度, 并且稻田养殖模式下的泥鳅有更强的免疫能力<sup>[7]</sup>, 稻田养殖模式下的鲤(*Cyprinus carpio*)有更好的抗氧化能力<sup>[8]</sup>。华南鲤(*Cyprinus carpio rubrofasciatus*)<sup>[9]</sup>、禾花鲤(*Procypris merus*)<sup>[10]</sup>和瓯江彩鲤(*C. carpio* var. *color*)<sup>[11]</sup>在稻田养殖模式下其肌肉品质更优。肠道菌群影响机体营养、代谢、免疫等多种生理活动, 可通过刺激肠道上皮先天免疫反应增强机体免疫机能, 其代谢产物可影响肌肉的代谢和功能<sup>[12-14]</sup>。养殖模式的不同会改变肠道菌群, 进而对宿主免疫力与肌肉品质造成影响, 而在夏秋两季稻田和池塘养殖模式对建鲤肠道菌群组成、肠道免疫酶活性的影响还未

收稿日期: 2020-05-19; 修订日期: 2020-07-07.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900302); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJZD-K201803501).

作者简介: 赵柳兰(1983-), 女, 博士, 副教授, 从事水产动物健康养殖研究. E-mail: zhaoliulan2007@163.com

通信作者: 杨淞, 博士, 教授, 从事水产动物健康养殖研究. E-mail: ysys210@hotmail.com

见报道。本研究旨在探究养殖模式对肠道菌群、免疫酶活的影响,同时对收获建鲤的肌肉氨基酸风味进行对比分析,为不同养殖模式下建鲤的健康管理及肌肉风味评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验建鲤采自重庆市万州区养殖场的同一批鱼种,5月下塘,初始体重(8.33±1.33)g。池塘养殖模式和稻田养殖模式各选取3个池塘和3个稻田进行养殖实验,于2018年6月(夏季)和2018年9月(秋季)分别进行取样,共分为4组:夏季池塘组(夏池,SP),夏季稻田组(夏稻,SR),秋季池塘组(秋池,AP)和秋季稻田组(秋稻,AR)。其中稻田面积1333 m<sup>2</sup>,养殖密度60尾/100m<sup>2</sup>,池塘面积667 m<sup>2</sup>,养殖密度300尾/100m<sup>2</sup>。每次采样时每个池塘和稻田中分别随机挑选10尾建鲤作为实验用鱼,共计120尾。取样时鱼体数据见表1。采样为现场采样,使用MS-222对建鲤进行麻醉处理后,解剖,取全肠道组织,以及靠近头部背部肌肉样品,分别用锡箔纸包裹后置于EP管中,干冰转运至实验室后于-80℃冰箱保存。对肠道进行微生物多样性和免疫酶活性分析,肌肉进行游离氨基酸含量分析。

表 1 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤收获数据

Tab. 1 Harvest data of Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

| 指标<br>index          | 组别 group   |            |              |             |
|----------------------|------------|------------|--------------|-------------|
|                      | 夏季池塘 SP    | 夏季稻田 SR    | 秋季池塘 AP      | 秋季稻田 AR     |
| 体重/g<br>body weight  | 53.43±6.34 | 60.70±9.80 | 156.84±63.12 | 98.43±14.21 |
| 体长/cm<br>body length | 12.09±0.70 | 12.80±0.62 | 19.77±2.66   | 15.25±0.81  |
| 全长/cm<br>full length | 14.84±0.89 | 15.70±0.85 | 24.55±3.30   | 18.97±0.86  |

1.2 总 DNA 提取

从每组肠道样本中取出10个样品,冰上自然解冻,每个消化道组织均匀剪取约1cm用于总DNA提取。采用TIANamp Stool DNA Kit (TIANGEN,

中国)试剂盒对剪取的组织样本提取微生物总DNA。

1.3 16S rDNA 序列 PCR 扩增和高通量测序

将通过试剂盒提取的微生物总DNA进行PCR扩增,扩增序列为16S rDNA V3~V4高变区的序列,选取的引物为341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'),经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,使用Thermo fisher公司的Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 文库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过Qubit定量和文库检测合格后,使用Thermofisher的IonS5TMXL进行上机测序。16S rDNA高通量测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.4 肠道免疫酶活测定

每个实验组的每个池塘和稻田各取出5个肠道组织样品,分别剪取一部分称重,按1:9(W/V)的比例加入适当的超纯水,冰浴匀浆,4℃3000 r/min离心10 min,取上清液作为粗酶提取液,分别按照非特异性免疫酶(溶菌酶LZM,超氧化物歧化酶SOD,碱性磷酸酶AKP,酸性磷酸酶ACP)检测试剂盒(南京建成)说明书测定酶活。

1.5 肌肉游离氨基酸测定

将秋季的两组肌肉样本每组取出6个样品,每个肌肉样本分别剪取0.1g左右,进行氨基酸含量分析。首先,用超纯水以1:9(m/V)的比例匀浆肌肉,12000 g/min离心10 min,取上清液与磺基水杨酸按300:900(V/V)的比例混合。静置30 min后,以12000 g/min离心10 min,取上清液,用超高速全自动氨基酸分析仪(LA8080)测定氨基酸含量。

1.6 数据处理及统计分析

肠道微生物测序数据为fastq格式,使用Cutadapt软件进行过滤和条码分割,统计分析使用QIIME, Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca>), 百迈客生物科技有限公司BMKCloud云平台以及GraphPad Prism v8.0完成。根据OTUs聚类结果,一方面对每个OTU的代表序列进行物种标注,得到相应的物种信息和基于物种的丰度分布,同时计算OTUs丰度、

alpha 和 beta 多样性, 得到样本物种丰富度和均匀度信息, 以及不同样本或类群之间常见的和唯一的 OTUs 信息。另一方面, 在 OTUs 上进行多重序列比对, 进一步得到不同样本和群体的群落结构差异, 并通过 PCoA 降维图显示出来。肠道免疫酶活与肌肉氨基酸结果采用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm SD$ )表示, 免疫酶活结果用 GraphPad Prism v8.0 进行双因素方差分析(two-way ANOVA), 肌肉氨基酸结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 显著水平取 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠道菌群特征

如图 1 所示, SP、SR、AP、AR 4 个实验组的结果表现为夏季和秋季稻田模式的 Chao 1 指数和 Shannon 指数均高于池塘模式, 但差异不显著

( $P>0.05$ ); 池塘模式下, 鲤秋季肠道菌群的 Shannon 指数显著高于夏季( $P<0.05$ )。说明稻田模式下鲤肠道的菌群多样性及丰富度在一定程度上高于池塘模式, 但池塘模式下鲤肠道菌群的多样性在季节间表现出了显著差异。

采用 PCoA 对样品的相似矩阵进行分析, 物种组成结构相似的样本会倾向于聚集在一起。通过相似性分析(Anosim)来衡量不同季节对微生物群落的影响, 结果如图 2 所示。同一组的样本比组间的样本聚得更近, 表示不同实验组样本间存在差异。且不同实验组样本呈现出季节性排列趋势, 相同季节内样品距离更近: 夏季稻田和池塘组的样品重叠在一起整体排在左上侧, 秋季样品则重叠在一起排列在右下侧, 同一季节较同种模式的实验组聚集更为接近。因此, 相对养殖模式而言, 季节的变化对建鲤肠道菌群的影响更大。

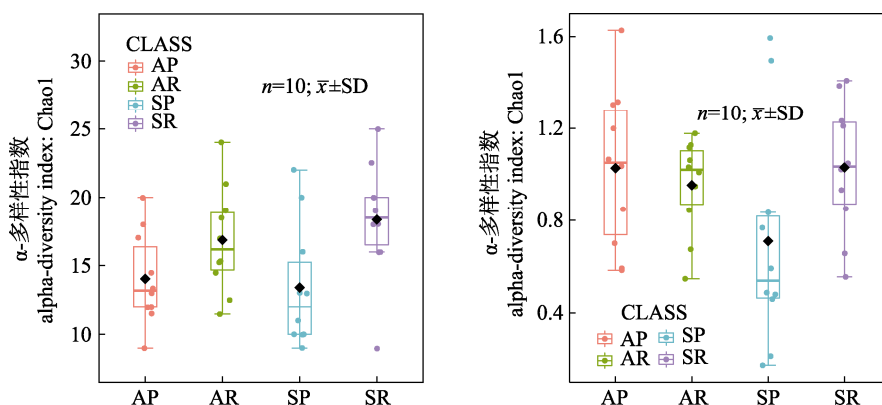


图 1 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群  $\alpha$  多样性

Fig. 1 The alpha-diversity of the intestinal microbiota of Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

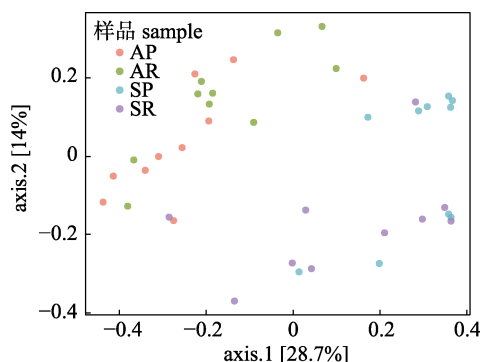


图 2 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群 PCoA 分析

Fig. 2 The PCoA of the intestinal microbiota of Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

### 2.2 肠道菌群结构

肠道菌群数据经高通量测序及处理, 共获得 1248 个 OTU, 样本 OTU 数量从高到低呈现为 SR(1002)>AP(899)>AR(897)>SP(815)。4 个实验组的共享 OTU 有 468 个。在夏季和秋季, 池塘和稻田模式的共享 OTU 分别为 608 和 658 个, 占比 48.72%和 52.72%; 而在池塘和稻田养殖模式, 夏季和秋季的共享 OTU 分别为 835 和 649 个, 占比 66.91%和 52.00% (图 3)。相同模式下, 夏季的共享 OTU 更多。而同种季节下, 稻田模式的共享 OTU 更多。

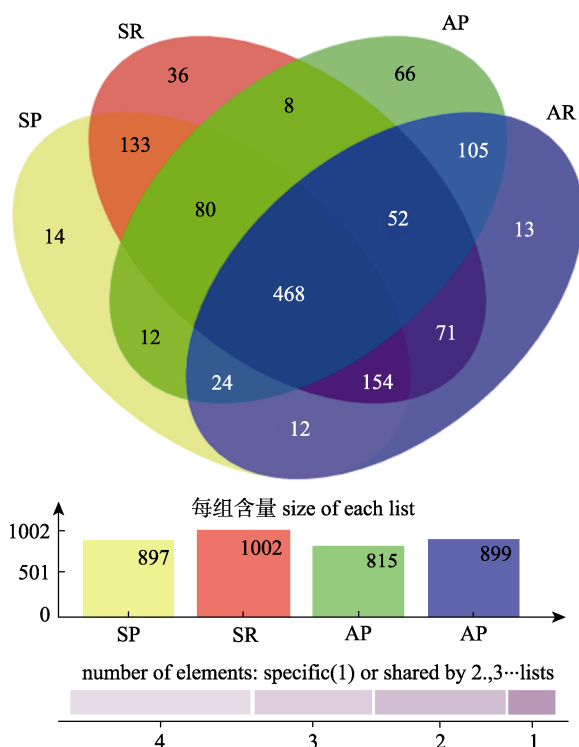


图 3 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群组成韦恩图

Fig. 3 Venn diagram representing shared OTUs of the intestinal microbiota in Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

通过对不同季节的两种养殖模式下建鲤肠道菌群的组成进行统计分析,从图 4 可见,SP 组、SR 组和 AR 组的优势菌门(相对丰度>5%)均为厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)和变形菌门(Proteobacteria),AP 组的优势菌门增加了蓝细菌门(Cyanobacteria)。不同菌门在夏秋两季随养殖模式不同,其丰度各异:厚壁菌门的丰度在

夏季为稻田模式高于池塘模式,秋季则相反,为池塘模式高于稻田模式;梭杆菌的丰度在夏季为池塘模式高于稻田模式,在秋季为稻田模式高于池塘模式;变形菌的丰度在夏季和秋季均为稻田模式高于池塘模式;蓝细菌门只在 AP 组为优势菌门。

## 2.3 肠道免疫酶活性

由表 2 可知,稻田和池塘两种养殖模式下建鲤肠道免疫酶活性均表现为夏季高于秋季,且与夏季相比,秋季 LAM、SOD、ACP、AKP 的免疫酶活性均出现了显著的降低( $P<0.05$ )。而在相同季节的不同模式下,只有 AKP 的活性在夏季和秋季均表现出了池塘模式显著高于稻田模式( $P<0.05$ )。

## 2.4 肌肉的氨基酸含量

如表 3 所示,秋季建鲤肌肉中共检出 18 种游离氨基酸。AP 组建鲤肌肉中游离氨基酸总量为 4139.95 mg/100 g,其中甘氨酸 Gly 的含量最高(285.74 mg/100 g),占游离氨基酸总量的 7.16%;其次是酪氨酸 Tyr(186.73 mg/100 g)和组氨酸 His(189.46 mg/100 g),分别占游离氨基酸总量的 4.68%和 4.75%。AR 组建鲤肌肉中游离氨基酸总量为 5381.67 mg/100 g,其中 His 含量最高(1212.19 mg/100 g),占游离氨基酸总量的 21.83%;其次是 Gly (374.20 mg/100 g)和丙氨酸 Ala (244.68 mg/100 g),分别占游离氨基酸总量的 6.74%和 4.41%。稻田模式下建鲤肌肉游离氨基酸中鲜味氨基酸总量(TUAA)、甜味氨基酸总量(TSAA)及苦味氨基酸总量(TBAA)均高于池塘模

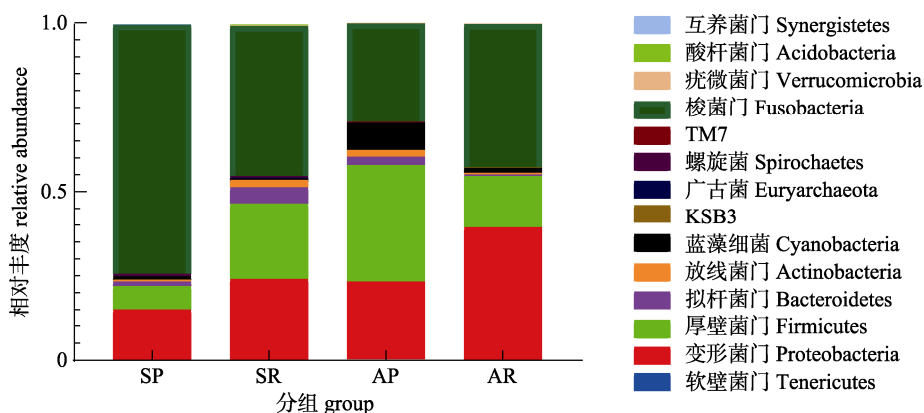


图 4 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群门水平结构特征

Fig. 4 The structural characteristics of intestinal microbiota at phylum level in Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

表 2 夏季和秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肠道非特异性免疫酶活力

Tab. 2 Intestinal immune enzyme activities of Jian carp from pond and rice field in summer and autumn

指标 index

组别 group

SP

SR

AP

AR

溶菌酶/(μg/mL prot) LZM

63.98±3.74

66.67±1.80

57.44±0.91<sup>b</sup>

57.02±1.04<sup>b</sup>

超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD

0.21±0.01

0.27±0.03

0.12±0.01<sup>b</sup>

0.12±0.02<sup>b</sup>

酸性磷酸酶/(King unit/g prot) ACP

2.77±0.16

2.69±0.07

1.74±0.45<sup>b</sup>

1.21±0.14<sup>b</sup>

碱性磷酸酶/(King unit/g prot) AKP

4.10±0.61

0.78±0.09<sup>a</sup>

0.81±0.31<sup>b</sup>

0.28±0.14<sup>ab</sup>

n=5;  $\bar{x}\pm SD$

注: a 表示同季节不同模式数据间差异显著( $P<0.05$ ), b 表示同模式不同季节数据间差异显著( $P<0.05$ )。

Note: a represents significant differences between different mode in the same season ( $P<0.05$ ). b represents significant difference between different seasons under the same mode ( $P<0.05$ ).

表 3 秋季池塘、稻田两种养殖模式下建鲤肌肉中游离氨基酸的含量

Tab. 3 Content of delicious amino acid in fresh muscle of Jian carp from pond and rice field in autumn

分类 classification

名称 name

阈值/(mg/100 mL) threshold

池塘 pond

稻田 rice field

含量/(mg/100 g) content

滋味活性值/(mg/mL) taste active value

占比/% percentage

含量/(mg/100 g) content

滋味活性值/(mg/mL) taste active value

占比/% percentage

鲜味氨基酸 umami amino acid

天冬氨酸 Asp

100

7.75±1.38\*

0.08

0.19

20.15±3.99

0.20

0.36

谷氨酸 Glu

30

66.33±22.39\*

2.21

1.66

132.62±9.38

4.42

2.39

甜味氨基酸 sweetish amino acid

丙氨酸 Ala

60

54.39±27.97\*

0.91

1.36

244.68±47.43

4.08

4.41

甘氨酸 Gly

130

285.74±11.74\*

2.20

7.16

374.2±26.45

2.88

6.74

丝氨酸 Ser

150

101.08±15

0.67

2.53

80.17±5.11

0.53

1.44

苏氨酸 Thr

260

37.09±5.55\*

0.14

0.93

73.18±11.07

0.28

1.32

苦味氨基酸 bitter amino acid

精氨酸 Arg

50

26.89±7.13\*

0.54

0.67

44.45±2.63

0.89

0.8

组氨酸 His

20

189.46±89.17\*

9.47

4.75

1212.19±70.17

60.61

21.83

异亮氨酸 Ile

90

25.55±4.65

0.28

0.64

28.91±3.38

0.32

0.52

亮氨酸 Leu

190

43.91±1.2

0.23

1.1

28.14±1.36

0.15

0.51

甲硫氨酸 Met

30

78.28±2.8\*

2.61

1.96

87±6.49

2.90

1.57

苯丙氨酸 Phe

90

63.44±4.46\*

0.70

1.59

74.43±7.68

0.83

1.34

缬氨酸 Val

40

27.19±6.05

0.68

0.68

31.69±3.99

0.79

0.57

酪氨酸 Tyr

—

186.73±48.27\*

—

4.68

34.46±3.26

—

0.62

鲜味氨基酸总量 TUAA

74.08\*

1.79

152.77

2.84

甜味氨基酸总量 TSAA

484.32\*

11.70

747.20

13.88

苦味氨基酸总量 TBAA

650.22\*

15.71

1664.10

30.91

游离氨基酸总量 TFAA

4139.95±210.65

100

5381.67±206.99

100

n=6;  $\bar{x}\pm SD$ ; mg/100 g

注: \*表示池塘和稻田两种养殖模式间的肌肉氨基酸含量存在显著差异( $P<0.05$ )。

Note: \* represent significant difference between pond and rice field culture modes ( $P<0.05$ ).

式( $P<0.05$ ), 表明建鲤肌肉风味在稻田养殖下比池塘养殖味道更鲜明。

3 讨论

3.1 养殖模式对建鲤肠道菌群特征的影响

肠道菌群是一个复杂而动态的微生物群落, 在纤维素物质的消化和营养物质的吸收代谢方面发挥了重要作用, 并且随着消化器官的生长, 肠道菌群的种类和数量逐渐趋于稳定<sup>[15-16]</sup>。而非生物因素对细菌群落变化影响较大, 如温度、盐度及氨氮等, 这些因素随季节变化明显。在对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和海鲈(*Dicentrar-*

*chus labrax*)的研究中发现, 温度和盐度是微生物群落组成的重要驱动因素, 数量较多的优势菌群会出现在温暖的月份, 而真核微生物会出现在寒冷的月份<sup>[5-6]</sup>。在本研究中, 稻田养殖模式下建鲤的肠道菌群丰度在夏季和秋季均高于池塘养殖模式, 同时从 PCoA 结果可知, 建鲤肠道微生物群落的变化与季节的相关性更强, 季节对肠道菌群的影响大于养殖模式差异。

环境及发育时期会影响鱼类肠道菌群组成<sup>[16]</sup>。对夏季和秋季不同养殖模式下建鲤肠道菌群组成分析发现, SP 组、SR 组、AR 组和 AP 组的共有优势菌门为厚壁菌门、梭杆菌门和变形菌门, AP 组的优势菌门增加了蓝细菌门。肠道微生物菌群能够帮助宿主发挥吸收功能, 帮助宿主完成营养物质的转运。在对人类的研究中发现, 厚壁菌门可能会促进宿主的营养转运<sup>[17-18]</sup>, 而其在鱼类肠道中发挥的作用有待进一步研究。在夏季稻田模式下建鲤肠道中厚壁菌门的丰度较高, 而秋季池塘模式下建鲤肠道中厚壁菌门的丰度较高。这说明夏季的建鲤在稻田养殖模式下可能有更优的营养转运能力, 且夏季是建鲤养殖投喂的重要时间, 因此, 可以在稻田养殖模式中适当增加饵料, 充分利用稻田养殖模式下建鲤的营养转运能力。而秋季为池塘养殖建鲤肠道厚壁菌丰度更高。从表 1 可以看出, 夏季稻田养殖建鲤比池塘养殖建鲤体重增长更快, 秋季则相反, 与厚壁菌的变化趋势相同, 说明厚壁菌丰度的变化可能是影响建鲤生长的因素之一。变形菌作为水产养殖对象肠道菌群中的优势菌之一, 其相对丰度可以反映水产养殖的健康状况<sup>[19]</sup>。变形菌可刺激凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 获得更好的免疫力, 但其丰度的增加对养殖对象来说是潜在的致病风险<sup>[20]</sup>。在本研究中, 无论是夏季还是秋季, 稻田模式下建鲤肠道中的变形菌丰度均高于池塘, 这可能使稻田模式下的建鲤获得更好的免疫力, 但同时也增加了其患病的风险, 需在日常饲养中加强管理。有研究发现梭杆菌门中的菌属与胆固醇的含量呈正相关, 其相对丰度降低会促进机体对脂类的利用<sup>[21]</sup>。池塘养殖建鲤肠道梭杆菌丰度在秋季的丰度相对夏季显著减少, 可能与秋季处于收获

期池塘模式饵料投喂减少, 而稻田养殖建鲤可于养殖环境中自行觅食有关。蓝细菌作为一种经常在动物肠道内检测到的非固有微生物, 通常来自饵料或水环境中<sup>[22]</sup>。在本次的实验组中均有出现, 但只在 AP 组表现为优势菌门, 这可能与池塘的环境有关, 需进一步验证。

### 3.2 养殖模式对建鲤肠道免疫酶活性的影响

肠道作为机体的免疫器官之一, 具有微生物免疫屏障作用和化学免疫屏障作用, 其免疫酶活力会受到生存环境的影响。在对大鳞副泥鳅的研究中发现, 不同肠段的酶活性在池塘和稻田两种养殖模式中具有显著差异, 且稻田模式下前中肠的免疫力更强<sup>[23]</sup>。而本实验中除 AKP 的活性在夏季和秋季均表现为池塘模式显著高于稻田模式外, 其他酶的活性均无显著变化, 这可能与本次实验中取用的是全肠有关。在实验室中对鲤进行模拟稻田和池塘模式下的投喂实验发现, 稻田养殖环境下的混合饵料会减少鲤受到的氧化应激<sup>[24]</sup>。变形菌门作为建鲤肠道优势菌门之一, 其丰度的增加会导致肠道炎症<sup>[25]</sup>。稻田模式下的建鲤肠道中变形菌丰度在夏秋两季均高于池塘, 然而夏季和秋季建鲤肠道免疫酶活在模式间未出现显著差异, 这可能是机体自身的免疫能力与环境应激相适应的结果。在对鲤和大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 的研究中发现, 不同温度会使免疫酶活性出现不同的变化<sup>[26-27]</sup>。从夏季到秋季, 池塘组与稻田组的 LZM、SOD、ACP、AKP 酶活均出现了显著的降低。在夏季和秋季, 稻田和池塘养殖模式建鲤肠道免疫酶活变化趋势与温度的变化趋势相同, 表现出随温度降低而降低, 说明两种模式下酶活变化的主要原因是养殖环境温度变化。

### 3.3 养殖模式对建鲤肌肉风味氨基酸的影响

游离氨基酸是一种风味物质, 呈鲜、甜、苦等滋味, 其对滋味的贡献程度用味道强度值(TAV)表示, 当 TAV 的值大于 1 时, 说明该呈味物质对产品的滋味有显著影响, 且数值越大, 贡献越大<sup>[28]</sup>。根据建鲤肌肉中呈味氨基酸的种类的不同, AP 组建鲤肌肉中呈味氨基酸的含量表现为苦味(15.71%)>甜味(11.70%)>鲜味(1.79%), 而 AR 组建鲤肌肉中呈味氨基酸的含量表现为苦味

(30.91%)>甜味(13.88%)>鲜味(2.84%)。AP 和 AR 组对建鲤肌肉滋味均有显著贡献的氨基酸为 Glu、Gly、His、Met, AR 组增加了 Ala。从这 5 种氨基酸的不同作用来看, Glu 作为一种重要的鲜味氨基酸, 对肌肉增鲜有重要作用<sup>[29]</sup>; Gly 和 Ala 呈甜味, 同时与 Glu 有协同作用, 在对肌肉的甜味做出贡献的同时可提升鲜味<sup>[30]</sup>; His 虽是一种苦味氨基酸, 但能使水生动物的肉质变得更鲜美<sup>[31]</sup>; 但关于 Met 调控肌肉品质的研究较少, 还需进一步研究<sup>[32]</sup>。4 种对建鲤肌肉滋味有显著贡献的氨基酸均为在稻田模式下的含量高于池塘模式( $P<0.05$ ), 且 TUAA、TSAA 及 TBAA 均高于池塘模式( $P<0.05$ )。在对不同养殖模式下华南鲤肌肉的研究中发现, 在稻田中养殖 5 个月后的华南鲤总脂肪含量低, 两种模式对作为蛋白源的水解氨基酸含量无显著影响<sup>[9]</sup>。本实验中的建鲤在稻田中养殖 4 个月后发现, 稻田养殖建鲤肌肉中作为风味物质的游离氨基酸含量显著高于池塘养殖建鲤。厚壁菌门作为建鲤肠道优势菌门, 具有诱导动物机体沉积脂肪, 促进脂肪储存的作用<sup>[33]</sup>。夏季稻田养殖建鲤肠道中厚壁菌门丰度较池塘模式更高, 秋季则相反, 这可能是华南鲤稻田养殖后肌肉中总脂肪含量低于池塘模式的原因。大多数风味物质易溶于脂类, 脂质氧化产物与美拉德反应产物相互作用产生特征滋味<sup>[34]</sup>。SR 组与 AR 组建鲤肠道中梭杆菌门丰度无明显差异, AP 组较 SR 组出现大幅降低, 而梭杆菌门丰度的降低会促进机体对脂类的利用, 造成池塘养殖建鲤肌肉中风味物质含量降低。

#### 4 结论

本研究结果表明, 夏秋两季稻田与池塘模式下建鲤肠道微生物与免疫酶活的变化均与季节的相关性更大。夏季和秋季稻田与池塘两种模式间肠道菌群变化较大, 但免疫酶活差异不显著, 可能是自身免疫力与环境应激相互影响的结果。两种养殖模式下建鲤生长变化与厚壁菌门丰度变化表现一致, 而秋季稻田养殖建鲤肌肉风味较池塘养殖建鲤更鲜美, 可能与稻田养殖建鲤肠道中梭杆菌门丰度相对稳定而池塘养殖建鲤在秋季梭杆

菌门丰度降低有关。

#### 参考文献:

- [1] Cheng Y X, Liu H T, Chang D, et al. A comparative study of microbiota from the intestine of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and their culture environment, between rice-crab co-culture and crab monoculture models[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 682-690. [成永旭, 刘洪天, 常东, 等. 稻蟹共作与蟹单作模式下中华绒螯蟹肠道及养殖环境细菌群落组成比较[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 682-690.]
- [2] Tong X H, Dong Z J, Miao W M, et al. The heterosis of F<sub>1</sub> hybrids (jian carp × huanghe carp) and path analysis of main growth traits[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(3): 159-163. [佟雪红, 董在杰, 缪为民, 等. 建鲤与黄河鲤的杂交优势研究及主要生长性状的通径分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(3): 159-163.]
- [3] Merrifield D L, Dimitroglou A, Foey A, et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids[J]. Aquaculture, 2010, 302(1-2): 1-18.
- [4] Fujimura K E, Slusher N A, Cabana M D, et al. Role of the gut microbiota in defining human health[J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2010, 8(4): 435-454.
- [5] Mitra A, Mukhopadhyay P K, Homechaudhuri S. Understanding probiotic potentials of bacillus bacterial population isolated from *Chitala chitala* (Osteoglossiformes; Notopterygidae) by comparing the enzyme activity in vitro[J]. International Journal of Pure and Applied Zoology, 2014, 2: 120-127.
- [6] Duarte L N, Coelho F J R C, Cleary D F R, et al. Bacterial and microeukaryotic plankton communities in a semi-intensive aquaculture system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A seasonal survey[J]. Aquaculture, 2019, 503: 59-69.
- [7] Yang S, Du J, Duan Y L, et al. Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments[J]. BMC Microbiology, 2018, 18: 113.
- [8] Yang S, Du J, Luo J, et al. Effects of different diets on the intestinal microbiota and immunity of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(5): 1327-1338.
- [9] Ma D M, Zhu H P, Huang Z H, et al. Comparison of nutrient components in muscle of *Cyprinus carpio rubrofasciatus* cultured in paddy field and pool[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(12): 2518-2524. [马冬梅, 朱华平, 黄樟翰, 等. 稻田和池塘养殖华南鲤肌肉营养成分比较分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2518-2524.]

- [10] Yang S X, Jiang A Q. Analysis on the flesh rate and the muscle nutrition component in *Procypris merus*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(2): 154-157. [杨四秀, 蒋艾青. 禾花鲤含肉率与肌肉营养成分分析[J]. 水生生态学杂志, 2009, 30(2): 154-157.]
- [11] Li C, Yao J J, An M, et al. Analysis of biochemical composition in muscle of *Cyprinus carpio* var. *color* cultured in paddy field of Guizhou[J]. Acta Zoonutrimenta Sinica, 2010, 22(2): 505-510. [李川, 姚俊杰, 安苗, 等. 贵州稻田养殖瓯江彩鲤肌肉生化成分分析[J]. 动物营养学报, 2010, 22(2): 505-510.]
- [12] Dodd D, Spitzer M H, Van Treuren W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites[J]. Nature, 2017, 551(7682): 648-652.
- [13] Li Z, Yi C X, Katiraei S, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit[J]. Gut, 2018, 67(7): 1269-1279.
- [14] Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2005, 243(1-4): 241-254.
- [15] Flint H J, Scott K P, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2012, 9(10): 577-589.
- [16] Mouchet M A, Bouvier C, Bouvier T, et al. Genetic difference but functional similarity among fish gut bacterial communities through molecular and biochemical fingerprints[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(3): 568-580.
- [17] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480-484.
- [18] Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the Zebrafish[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(3): 277-288.
- [19] Rizzatti G, Lopetuso L R, Gibiino G, et al. Proteobacteria: A common factor in human diseases[J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 9351507.
- [20] Gao S, Pan L Q, Huang F, et al. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Aquaculture, 2019, 499: 109-118.
- [21] Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(Sup 1): 4592-4598.
- [22] Qiao F, Lei K, Li Z C, et al. Transcriptomic responses of the freshwater snail (*Parafossarulus striatulus*) following dietary exposure to cyanobacteria[J]. Science of the Total Environment, 2018, 624: 153-161.
- [23] Yang S, Duan Y L, Zhang J, et al. Observational comparisons of intestinal microbiota characterizations, immune enzyme activities, and muscle amino acid compositions of loach in paddy fields and ponds in Sichuan Province[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(11): 4775-4789.
- [24] Yang S, Luo J, Long Y N, et al. Mixed diets reduce the oxidative stress of common carp (*Cyprinus carpio*): Based on microRNA sequencing[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 631.
- [25] Jia P P, Sun T, Junaid M, et al. Chronic exposure to graphene oxide (GO) induced inflammation and differentially disturbed the intestinal microbiota in zebrafish[J]. Environmental Science: Nano, 2019, 6(8): 2452-2469.
- [26] Sun J L, Zhao L L, Cui C, et al. Influence of long-term temperature stress on respiration frequency,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Thermal Biology, 2019, 83: 165-171.
- [27] Sun J L, Zhao L L, Liao L, et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 923-936.
- [28] Chen D W, Zhang M. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1200-1205.
- [29] Li X, Wei P P, Liu S T, et al. Comparative study on growth, feeding, amino acid composition, and nutritional quality of *Dicentrarchus labrax* juveniles under different light photoperiods[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(9): 1062-1074. [李鑫, 魏平平, 刘松涛, 等. 不同光周期下欧洲舌鳎鲈鱼生长、摄食和肌肉营养成分的比较[J]. 中国水产科学, 2020, 27(9): 1062-1074.]
- [30] Wang S H, Cheng Y X, Shi L Y, et al. A comparative study between edible yield and quality of adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in autumn[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(10): 1196-1209. [王世会, 成永旭, 石连玉, 等. 秋季不同时期上市中华绒螯蟹可食率和品质比较[J]. 中国水产科学, 2020, 27(10): 1196-1209.]
- [31] Zhuang K J, Wu N, Wang X C, et al. Effects of 3 feeding modes on the volatile and nonvolatile compounds in the edible tissues of female Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4): S968-S981.
- [32] Wang L S, Fan Z, Wu D, et al. Research progress of methionine nutrition in aquatic animals[J]. Chinese Journal of Ani-

- mal Nutrition, 2020, 32(11): 4981-4991. [王连生, 范泽, 吴迪, 等. 水产动物蛋氨酸营养研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(11): 4981-4991.]
- [33] Tilg H, Moschen A R. Relevance of TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2011, 5(2): 155-158.
- [34] Zhang J Y, Zhao Y L, Ding Y T, et al. Relationships of lipid oxidation and protein oxidation with flavor characteristics of meat products[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(7): 1417-1424. [张建友, 赵瑜亮, 丁玉庭, 等. 脂质和蛋白质氧化与肉制品风味特征相关性研究进展[J]. 核农学报, 2018, 32(7): 1417-1424.]

## Analysis and comparison of intestinal microbiota, immune enzyme activities, and muscle flavor of Jian carp in two culture modes

ZHAO Liulan<sup>1</sup>, LONG Yanan<sup>1</sup>, LUO Jie<sup>1</sup>, LIU Qiao<sup>1</sup>, ZHOU Jian<sup>2</sup>, DU Jun<sup>2</sup>, ZHOU Ya<sup>3</sup>, YANG Baiwei<sup>4</sup>, YANG Song<sup>1</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. Fisheries Institute of Sichuan, Chengdu 611731, China;
3. Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155, China;
4. Sichuan Provincial Governor Kishima Seed Farm, Chengdu 611247, China

**Abstract:** To investigate the differences in the intestinal health and muscle flavor of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) raised in rice field and pond cultivation modes, this experiment compared and analyzed the intestinal microbiota, intestinal immune enzyme activity, and muscle amino acid composition of Jian carp from the two cultivation modes in both summer and autumn. The results showed that the change in intestinal microbiota was related to the seasons. The dominant microbiota under the two modes in summer and autumn were Firmicutes, Fusobacteria, and Proteobacteria, and the diversity of intestinal microbiota in autumn was significantly higher than that in summer under the pond mode ( $P<0.05$ ). The immune enzyme activity in the intestines was significantly decreased from summer to autumn ( $P<0.05$ ), and in the summer, the activity of AKP was significantly higher in pond than that in rice field cultivation ( $P<0.05$ ). A total of 18 types of free amino acids were detected in the muscle of Jian carp. The contents of aspartic acid, glutamic acid, alanine, glycine, threonine, arginine, histidine, and phenylalanine were significantly higher in the rice field ( $P<0.05$ ), and the total contents of fresh, sweet, and bitter amino acids were all higher in the rice field ( $P<0.05$ ). In conclusion, under the rice field mode, Jian carp can obtain a more stable intestinal microbiota and a stronger flavor muscle.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *jian*; rice field culture; pond culture; intestinal microbiota; immune enzyme activities; amino acids

**Corresponding author:** YANG Song. E-mail: ysys210@hotmail.com