

文章编号: 1000-0615(2016)05-0776-09

DOI: 10.11964/jfc.20150709967

饥饿及恢复喂食对花鲈肠道菌群多样性的影响

潘艳艳, 顾晓英, 张德民, 钱云霞*

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了研究饥饿及恢复摄食对花鲈肠道壁及内容物微生物菌群的影响, 实验运用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术分析了花鲈经2周饥饿, 恢复喂食1周和恢复喂食2周后肠道壁及其内容物菌群特征及多样性的变化。结果显示: 饥饿会导致花鲈肠道壁细菌群落发生明显变化, 引起差异的主要细菌为T-RFs 496、437、450、155 bp等所代表菌; 经2周饥饿, 肠壁T-RF 496 bp大肠杆菌(*Escherichia*)相对丰度从实验开始的43.11%±3.95% (C0肠壁组)下降为21.25%±9.97% (S2R0肠壁组), 细菌多样性指数 H' 、 E' 和 $1/D$ 均增大; 恢复喂食2周后, 肠道壁菌群结构逐渐恢复, T-RF 496 bp大肠杆菌的相对丰度逐渐上升到55.49%±8.37% (S2R2组), 3个多样性指数均减小至原有水平; 花鲈肠道壁和内容物的菌群有较大不同, 但是两者的主要细菌类群都是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 其中, γ -变形菌纲是花鲈肠道的最主要细菌群。本研究为进一步阐述消化道微生物功能奠定了基础, 也为海水鱼类肠道菌群研究提供基础数据。

关键词: 花鲈; 饥饿; 恢复喂食; 肠道菌落; 末端限制性片段长度多态性技术

中图分类号: Q 938.8; S 965

文献标志码: A

鱼类肠道菌群是肠道的重要组成部分, 对鱼类的消化吸收、免疫以及器官发育等都有重要的影响^[1]。鱼类肠道菌群在影响宿主鱼的同时, 其组成也受到宿主鱼与外界环境的影响^[2], 二者形成了一个相互依赖、相互制约的微生物生态系统, 保持该微生物生态系统的稳定是鱼体健康的重要前提, 因此鱼类消化道微生物生态系统的研究对提高鱼类的饲料利用率、减少病原菌在肠道内的定殖都具有重要的意义。

鱼类在自然环境中经常会出现营养匮乏甚至饥饿, 其中许多鱼类在食物供给恢复正常后将出现快速的迸发式的补偿生长, 因而关于鱼类饥饿的研究引起许多研究者的兴趣^[3]。饥饿对鱼类消化系统影响的研究主要集中在其组织结构及消化酶的变化, 如长时间的饥饿胁迫会使鱼类的胃、肠道黏膜和腺体萎缩^[4-5]以及脂肪酶、

蛋白酶和淀粉酶等消化酶活力下降^[3, 5-7], 而恢复喂食后消化酶活性会逐渐增加^[6-7]。但饥饿及恢复喂食影响鱼类肠道菌群多样性方面的研究则较少。Dhanasiri等^[8]采用DGGE技术分析比较了捕捞后野生大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)在喂养和禁食条件下肠道内菌群结构及多样性的变化, 而国内仅见李星浩等^[9]对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)饥饿及恢复投喂对消化道微生物的影响。

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)又称海鲈、七星鲈, 属鲈形目(Perciformes), 是我国海水网箱养殖的主要经济种类之一。本实验采用基于细菌16S rDNA的末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析技术对网箱养殖花鲈在饥饿及恢复投喂后其肠道菌群多样性的变化进行了研究, 并且构建细菌16S rDNA基因克隆文库, 确定花鲈肠道中优势菌群的种类。本实验为海水养殖鱼

收稿日期: 2015-07-13 修回日期: 2015-12-22

资助项目: 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA092001); 宁波大学“水产”浙江省重中之重开放基金(xkzsc1513)

通信作者: 钱云霞, E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn

类肠道菌群研究提供了一些基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与样品采集

饥饿试验于2013年5—6月在浙江省宁波象山港的人工养殖网箱进行。将120条健康无病,没有投喂过抗生素和其他药物的花鲈置于4个不同的养殖网箱(普通网箱内层加以300目微孔径浮游生物网覆盖)。其中两个网箱为饥饿组,不投饵,另两个为对照组,每天正常投饵。实验开始前随机取4条鱼作为对照组C0,饥饿组2周后取样为S2R0,而恢复喂食1周后取样为S2R1组、恢复喂食2周为S2R2组,相应的对照组分别为C2、C3和C4,正常投喂。整个养殖期间,海水温度18.5~22.5℃,盐度25.0~27.5,饲料为冰冻小杂鱼(投饵量为体质量的5%),投喂时间为早上5点,取样时间为14:00,每次4条鱼,置于0℃保温箱冰浴带回实验室,用酒精棉擦拭鱼体表面,在无菌条件下解剖,剪下全部肠道,轻轻挤出内容物,将肠道剖开,用灭菌的PBS溶液冲洗3次后作为肠壁样品,冻于-80℃冰箱里,等待下一步操作。

1.2 肠道和内容物细菌总DNA提取

细菌总DNA的提取采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒,溶于30 μL Buffer AE中,经1%琼脂糖凝胶电泳分离检测DNA完整性后置于-80℃冰箱里保存。

1.3 细菌16S rDNA扩增

选5'端FAM荧光标记的引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和普通引物926R(5'-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3')对细菌16S rDNA基因进行扩增。50 μL反应体系:25 μL primx *Tap*, 1 μL F, 1 μL R, 5 μL BSA, 4 μL模板DNA, 14 μL H₂O。扩增条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30个循环; 72℃ 7 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物特异性后,用DNA胶回收试剂盒(上海碧云天)切胶纯化,微量荧光分光光度计测定DNA浓度。

1.4 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析

细菌的16S rDNA基因PCR纯化产物用限制性内切酶*Msp* I (TaKaRa公司)酶切3 h后,乙醇沉淀后溶于10 μL灭菌ddH₂O,送至中国农业大学进行

基因扫描,得到T-RFLP图谱。T-RFLP谱图用Peak Scanner程序进行分析,选择ROX-1200为分子量内标,舍去<50 bp和>900 bp的片段。图谱中每一个峰的峰高与所有峰总高的比值,作为各OUT的相对丰度,并舍去相对丰度<0.5%的T-RFs^[10]。细菌多样性指数 $H' = -\sum P_i \ln P_i$; 均匀度指数 $E' = H' / \ln S$; 辛普森指数倒数 $1/D = 1/\sum P_i^2$ 。其中, P_i 为第*i*个OUT的相对丰度, S 为OUT总数。

用R软件的23727_T_RFLP_Analysis_Ver_20090203.r脚本程序^[11]分析样品数据,生成所有样品汇总表ClusBinMatrix.txt,用PAST软件进行PCA分析。

1.5 克隆测序和系统发育分析

用16S rDNA通用引物27F和926R分别扩增S2R1组的肠道壁和内容物DNA及其对照组C3组的肠道壁DNA,PCR条件同上。PCR产物纯化后与pMD18-TVector连接,转入大肠杆菌DH5-α感受态细胞筛选阳性克隆。每组样品随机选取30个阳性克隆进行测序,用MEGA 6.0中的Neighbor-Joining进行系统发育分析。

1.6 数据处理

SPSS 13.0软件分析所有实验数据,采用One-Way ANOVA分析显著性,方差齐时组间选择Duncan氏检验,方差不齐时组间选择dunnett T3检验。 $P < 0.05$ 表示有显著差异。

2 结果

2.1 基于T-RFLP图谱的细菌群落分析

样品组细菌总DNA经带荧光引物PCR扩增后用*Msp* I (C[^]CGG)酶切后得到的全部T-RFLP图谱(饥饿组没有内容物),发现花鲈肠壁样品细菌末端限制性片段(T-RFs)的长度主要集中在100~200 bp和400~600 bp左右,而内容物样品的T-RFs还另外在290~340 bp也有明显出峰(图1)。

2.2 基于T-RFLP图谱的PCA分析

对所有T-RFLP结果进行PCA分析(图2),结果显示,花鲈肠道壁样品都存在于第二、三象限,而肠道内容物样品则位于第一、四象限,且肠道壁各样品总体上比内容物样品聚集程度更紧密。表明无论是对照组还是实验组,其肠道壁各样品间菌群结构明显区别于肠道内容物

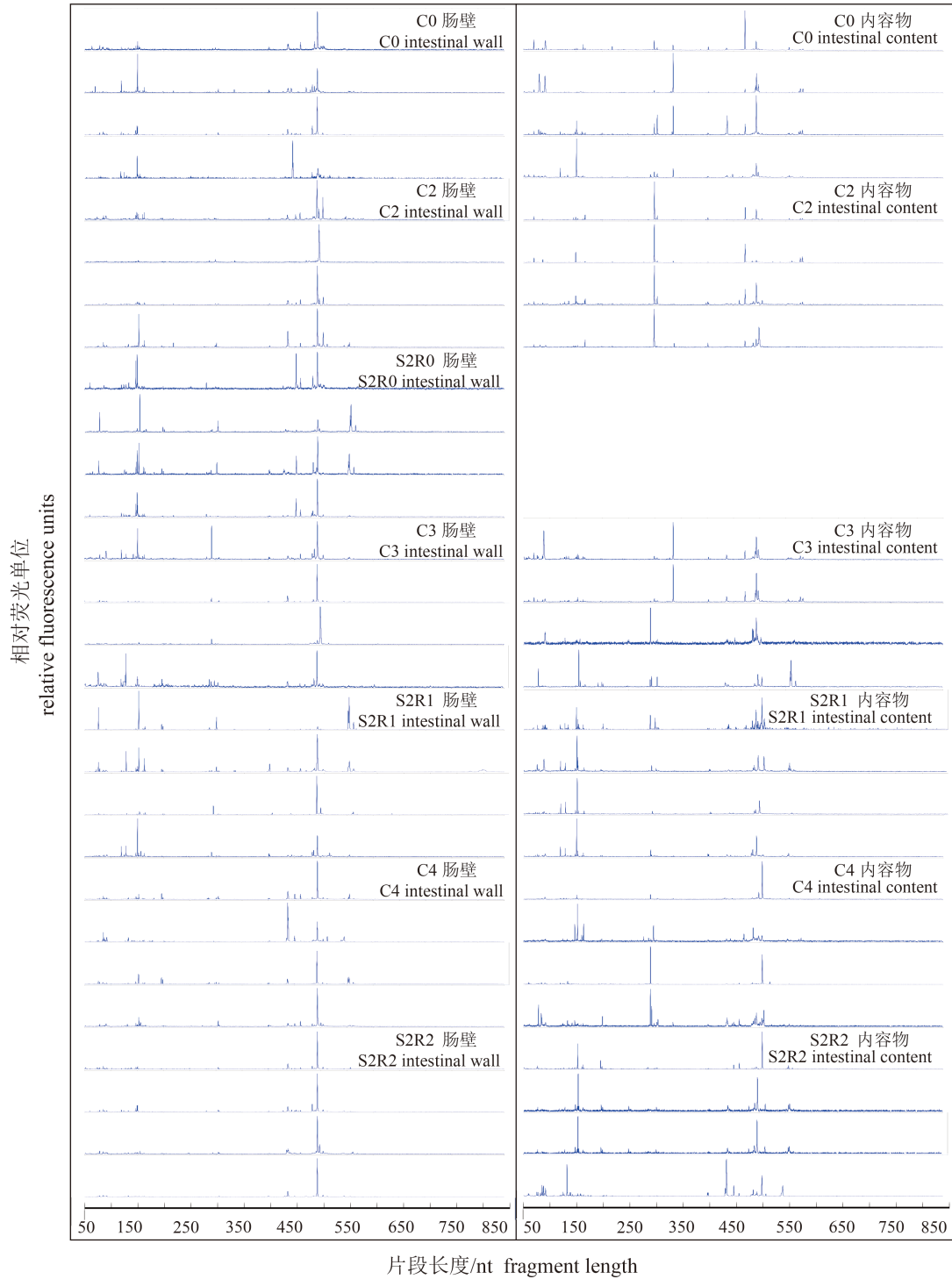


图1 花鲈肠道壁和内容物细菌群落的T-RFLP图谱

C0、C2、C3、C4为对照组，S2R0、S2R1、S2R2为实验组，下同

Fig. 1 T-RFLP profiles of bacterial communities of intestinal content and wall of *L. japonicus*

C0, C2, C3 and C4 represent control groups, S2R0, S2R1 and S2R2 are experimental groups, the same below

的菌群结构，且肠道壁样品间的菌群结构相似性高于内容物样品。

单独对肠道壁组样品细菌的T-RFLP结果进

行PCA分析，S2R0组集中于第三象限，S2R1组位于第二象限，而S2R2与对照组(C0、C2、C3、C4)位于第一、四象限(偶有在第二象限)，结果

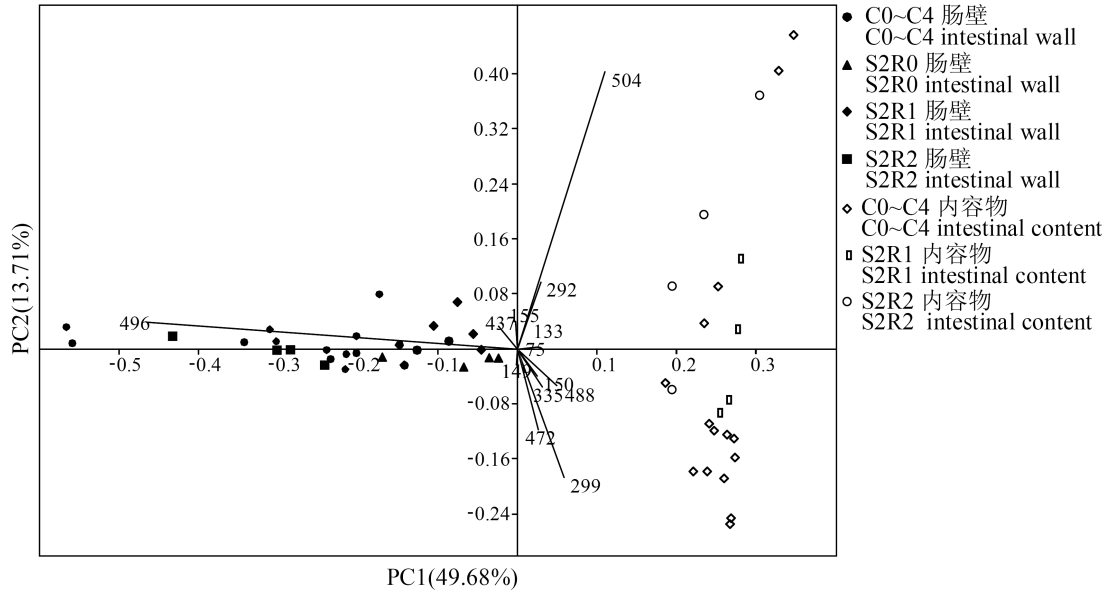


图 2 花鲈肠道16S rDNA基因的T-RFLP主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis based on T-RFLP profiles of 16S rDNA

显示, 实验组S2R0、S2R1与对照组的菌群结构存在一定差异, 而S2R2组与对照组的细菌菌群较接近, 意味着饥饿后经恢复喂食2周花鲈肠道的菌群结构已经与对照组相似(图 3)。引起各组样品分布差异的主要片段为T-RFs 496、554、450和155 bp等。图 4是上述片段在各组样品中的相对丰度, 对照组(C0、C2、C3、C4)肠壁细菌

主要T-RFs相似, 以T-RF 496、488、437 bp为主, 其中T-RF 496 bp峰值最大, 相对丰度均在40%以上。而T-RF 496 bp在S2R0组肠壁中仅占21.25%±9.97%, 在S2R1组占30.37%±3.15%, 在S2R2组上升到55.49%±8.37%, 与对照组C4的41.52%±5.40%接近, 而其他优势峰片段则逐渐消失。T-RF 437 bp与T-RF 496 bp变化类似, 其

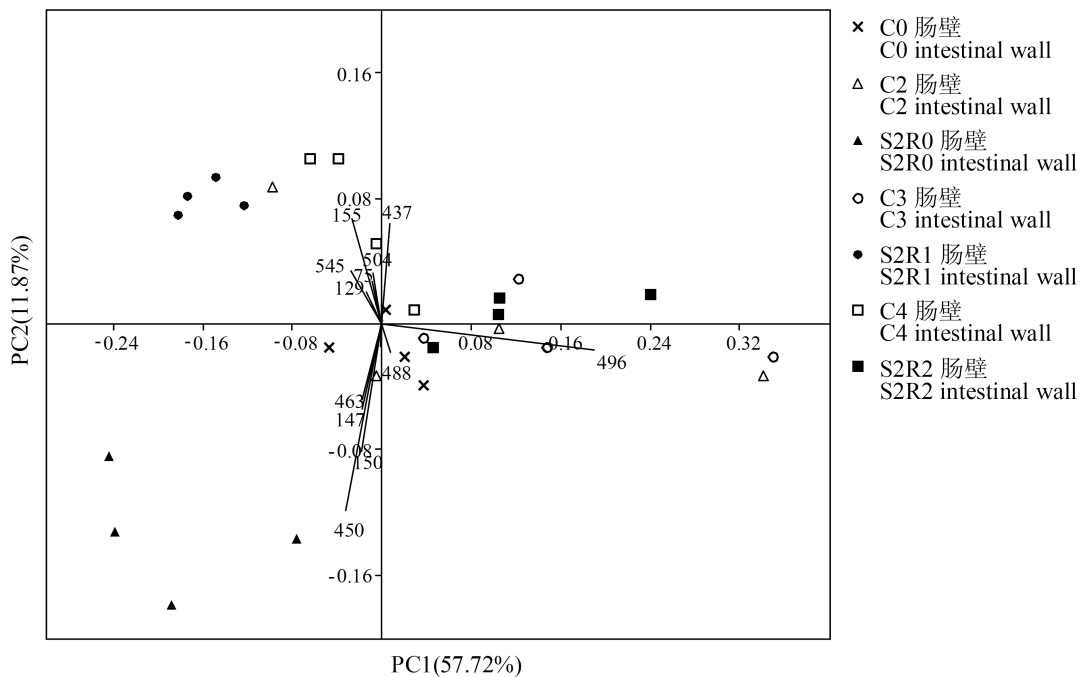


图 3 基于T-RFLP图谱的肠道壁细菌 PCA 分析

Fig. 3 Principal component analysis based on T-RFLP profiles of 16S rDNA from bacteria of intestinal wall

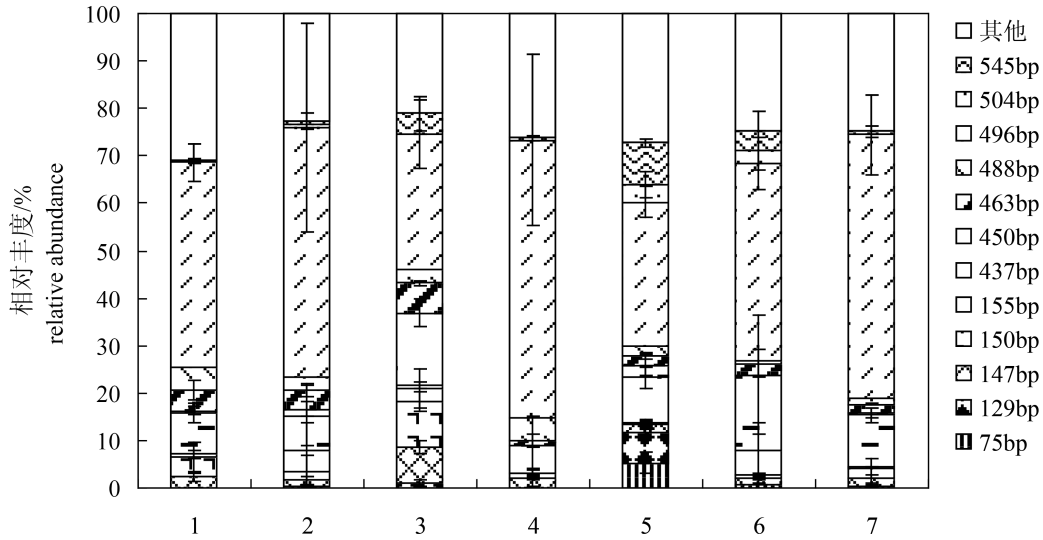


图 4 花鲈实验组与对照组中主要T-RFs的相对丰度

1. C0肠壁, 2. C2肠壁, 3. S2R0肠壁, 4. C3肠壁, 5. S2R1肠壁, 6. C4肠壁, 7. S2R2肠壁

Fig. 4 The relative abundance of the dominant T-RFs in fasting groups and control group

1. C0 intestinal wall, 2. C2 intestinal wall, 3. S2R0 intestinal wall, 4. C3 intestinal wall, 5. S2R1 intestinal wall, 6. C4 intestinal wall, 7. S2R2 intestinal wall

相对丰度在饥饿时减小恢复投喂时增大。在内容物中, T-RF 496 bp在所有对照组中的相对丰度均在20%以下, 明显低于肠壁。

2.3 基于T-RFLP图谱的细菌多样性分析

基于细菌16S rRNA基因T-RFLP的末端限制性片段长度的数目及其相对丰度, 计算了花鲈肠道细菌的Shannon多样性指数 H' 、均匀度指数 E' 和Simpson指数倒数 $1/D$ (表1)。花鲈肠道内容物细菌的3个多样性指数都大于对应的肠壁组, 总体差异不显著。饥饿2周S2R0组花鲈肠壁3个指

数 H' 、 E' 和 $1/D$ 都显著高于对照组C2($P>0.05$), 表明饥饿组肠壁各样品间细菌种类高于正常组, 细菌分布密度更均匀。恢复喂食过程中, 花鲈肠壁和内容物的3个指数都逐渐减小, 且恢复喂食2周后基本接近对照组C4。

2.4 细菌群落系统发育分析

选择S2R1组的肠道壁和内容物样品及其对照组C3组的肠道壁样品建立克隆文库并测序, 利用Mega 6.0软件对测序结果进行系统发育分析(图5), 并结合细菌T-RFLP结果, 对所得序列进

表 1 基于 T-RFLP 图谱的细菌多样性分析

Tab. 1 Analysis of bacterium diversity based on T-RFLP profiles

组名 group name	Shannon 多样性指数 H' Shannon Diversity index		均匀度指数 E' Evenness index		辛普森指数倒数 $1/D$ Simpson index	
	肠壁	内容物	肠壁	内容物	肠壁	内容物
	intestinal wall	intestinal content	intestinal wall	intestinal content	intestinal wall	intestinal content
C0	2.09±0.10 ^{bcd}	2.39±0.15 ^{cd}	0.74±0.02 ^{bcd}	0.81±0.03 ^{cd}	4.28±0.31 ^{abc}	7.44±1.17 ^{de}
C2	1.75±0.59 ^{ab}	2.03±0.28 ^{abcd}	0.62±0.20 ^{ab}	0.73±0.04 ^{abcd}	3.79±1.98 ^{ab}	5.30±1.11 ^{abcd}
S2R0	2.42±0.13 ^d		0.82±0.02 ^{cd}		7.28±0.79 ^{de}	
C3	1.62±0.57 ^a	2.42±0.21 ^d	0.58±0.17 ^a	0.83±0.05 ^{cd}	3.09±1.48 ^a	8.11±0.87 ^e
S2R1	2.22±0.18 ^{bcd}	2.47±0.03 ^d	0.80±0.06 ^{cd}	0.84±0.03 ^d	6.62±1.73 ^{cde}	8.36±0.57 ^e
C4	2.08±0.08 ^{abcd}	2.15±0.61 ^{abc}	0.73±0.03 ^{abcd}	0.77±0.19 ^{abc}	4.65±0.59 ^{abc}	6.43±1.93 ^{abcd}
S2R2	1.85±0.33 ^{ab}	2.17±0.25 ^{bcd}	0.61±0.11 ^{ab}	0.76±0.06 ^{bcd}	3.14±0.76 ^a	5.78±1.62 ^{bcd}

注: 同一个指数不同字母间表示差异显著($P<0.05$)

Notes: The different letter in same index means significant difference ($P<0.05$)

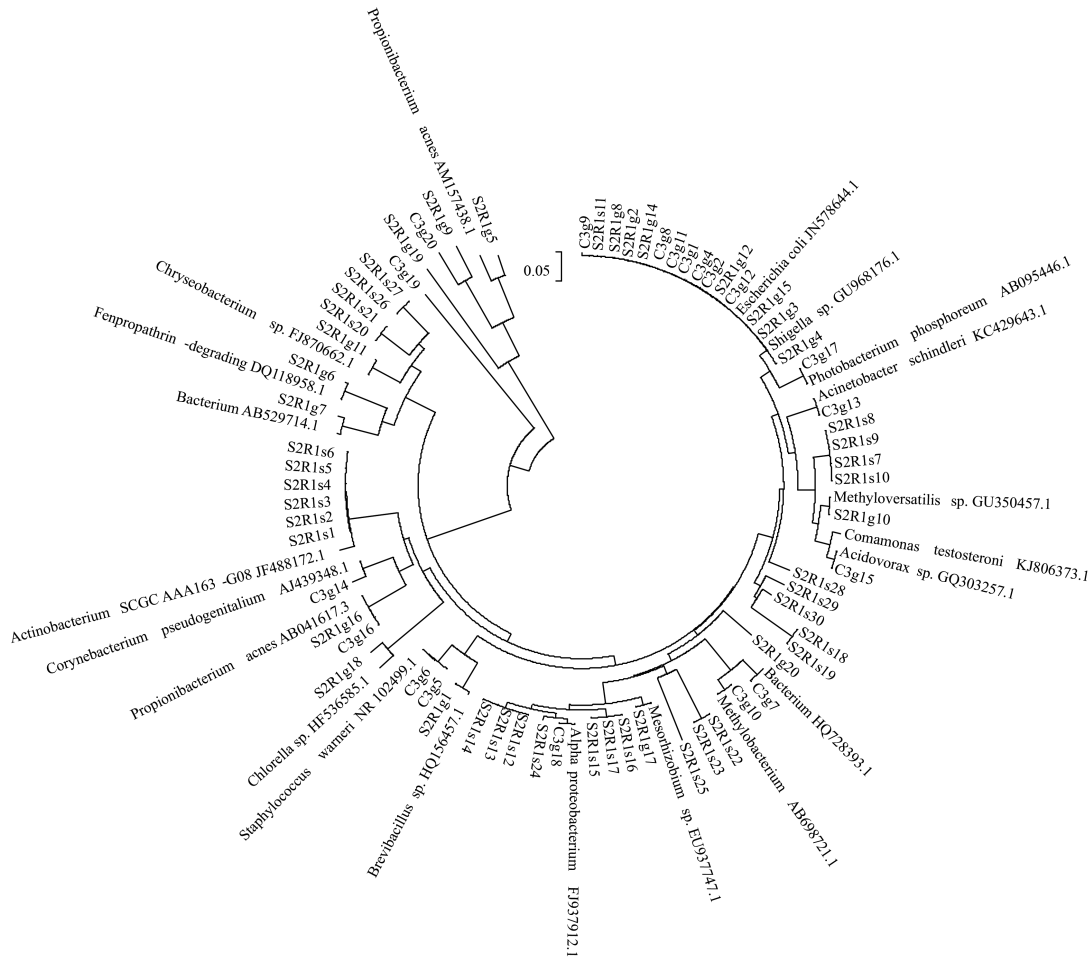


图 5 细菌 16S rDNA 基因序列的系统发育关系

Fig. 5 Phylogenetic relationship (Neighbor-Joining) of bacterial 16S rDNA gene sequences

行 *in silico* 酶切分析, 以鉴定主要 T-RFs 代表菌。结果发现, T-RF 496 bp 可能属于 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 的大肠杆菌 (*Escherichia*); T-RF 488 bp 可能属于 β -变形菌纲的食酸菌属 (*Acidovorax*); T-RF 463 bp 可能属于 γ -变形菌纲的假单胞菌属 (*Pseudomonas*); T-RF 450 bp、150 bp 可能均属于 α -变形菌纲的甲基杆菌属 (*Methylobacterium*); T-RF 155 bp 可能属于厚壁菌门的葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)。结合 T-RFLP 图谱的结果分析得到, γ -变形菌纲的细菌在对照组肠壁中平均占比在 51.64% 以上, 而在实验组 S2R0、S2R1 和 S2R2 的肠壁中平均占比分别在 30.85%、35.47% 和 59.15% 以上, 在肠道内容物中平均占 23.96% 以上。

3 讨论

本实验利用 T-RFLP 技术分析了饥饿及恢复

喂食对花鲈肠道壁及内容物的菌群结构及多样性特征的影响。PCA 结果均表明, 饥饿 2 周的 S2R0 组肠壁菌群结构与对照组明显不同, 而恢复喂食后, S2R1 组和 S2R2 组肠壁菌群基本接近对照组, 表明饥饿改变了花鲈肠道菌群的组成。鱼类肠道微生物易受到食物和水体环境的影响^[2], 如 Ringø 等^[12]用 3 种不同的食物投喂大西洋鲑鱼, 发现其肠道菌群变得各不相同; 郁二蒙等^[13]分别用冰鲜饲料与配合饲料养殖大口黑鲈 (*Micropterus Salmoides*), 两者肠道菌群组成相似性较低。Sugita 等^[14]报道莫桑比克罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 在仔鱼时期已建立肠道菌群, 其中大部分来自水体中的微生物。当花鲈饥饿时, 不再摄入食物, 肠道菌群的组成只受到水体环境等影响, 同时花鲈饥饿时, 其肠壁微生物所处的环境小生境也发生改变, 因而饥饿花鲈肠道菌群结构与对照组存在差异。

PCA结果也表明,花鲈肠道壁菌群明显区别于内容物菌群^[15-16],可能是肠道内容物由食物分解消化形成,其菌群更易受饲料中微生物的影响。虽然鱼类肠壁微生物也受到食物和环境的影响,但是肠壁有独特的核心菌群,同时这些原籍定殖菌群能抑制随饲料进入肠道的细菌在肠道壁发生定殖^[17],从而保持较稳定的菌群结构。如本实验中大肠杆菌(T-RF 496 bp)在肠道壁中具有高度稳定性,可能属于肠道的定殖菌群。

T-RFLP结果表明,对照组花鲈肠壁的优势菌群较单一,仅T-RF 496 bp,而饥饿2周S2R0组的优势菌群较多,且分布均匀,如T-RFs 496、150、450、463 bp等,同样,S2R0组的3个指数 H' 、 E' 和 $1/D$ 均显著高于对照组C2。以上均说明饥饿会使花鲈肠道壁的细菌多样性增高,且细菌分布密度的差异程度减小。随着喂食的恢复,大肠杆菌(496 bp)在肠道壁中含量逐渐增大,其他优势峰的数量相应减少,3个指数又逐渐下降。可能是恢复投喂在增加了能量来源的同时增加大量的微生物,造成不同种的细菌在肠壁上竞争加剧,而T-RF 496 bp代表菌在这过程中形成“优势种”,而导致其他细菌种类的相对数量减小。Kamad等^[18]研究已表明,消化道微生物物种间存在生存竞争关系,微生物物种间竞争强度的增加使得有限的生境内能容纳的微生物种类数量减少,该结果在宏观生态系统研究中也得到证实^[9,19]。

已有研究显示,鱼类肠道菌群主要由变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门组成^[20],其中变形菌门为最主要菌群^[16,20-21],在斑马鱼(*Danio rerio*)肠道核心菌群中占到60.51%±35.39%^[22],在青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)的肠道壁和肠道内容物中分别占52.6%和55.0%^[21]。本文结果也表明,变形菌门是花鲈肠道的最主要菌群,在所有部位的T-RFLP图谱中占38.19%~75.86%。变形菌门中又以 γ -变形菌纲比例最高,这可能是由于 γ -变形菌通常存在于贫营养环境中,如海洋沉积物或海水^[23],通过摄食进入花鲈肠道内。 γ -变形菌纲在4组对照组肠道壁的T-RFLP图谱中平均占比在51.64%以上,而在实验组S2R0、S2R1和S2R2的肠壁中平均占比分别在30.85%、35.47%和59.15%以上,在肠道内容物中平均占23.96%以上。说明饥饿处理使得花鲈肠道壁上的 γ -变形菌纲的细菌数量减少,而恢复喂食后,其数量又

增多,恢复至正常水平。

据报道,肠杆菌科(Enterobacteriaceae)是真鲷(*Pagrosomus major*)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)及条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)等鲈形目海水鱼的常见肠道优势菌群^[2],淡水虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中发现肠杆菌科也是其肠道主要优势菌之一^[24]。本实验中,肠杆菌科的细菌在花鲈肠道壁和内容物中均有较大含量,饥饿虽然使肠杆菌属占比显著降低,但其依然是优势菌群。在饥饿组花鲈肠道中出现的葡萄球菌属(T-RF 155 bp)作为肠道优势菌在其他文献中也有报道,如周志刚等^[2]研究发现肠杆菌属、葡萄球菌属均为欧洲鳎(*Solea solea*)的肠道优势菌群。另外,在本实验组和对照组的花鲈肠道中均发现食酸菌属,在最近对虹鳟^[25]和鲷^[20]肠道菌群的研究中,其作为肠道菌群也被发现,推测其可能与鱼肠道内发生的微生物脱氮有关。

综上所述,正常养殖花鲈肠道优势菌群较单一,主要为T-RF 496 bp所代表的大肠杆菌;饥饿会导致花鲈肠道壁细菌群落发生明显变化,引起差异的主要细菌为T-RFs 496、437、450和155 bp等所代表菌;经2周饥饿,肠壁T-RF 496 bp (*Escherichia*)相对丰度从实验开始的43.11%±3.95% (C0组)下降为21.25%±9.97%(S2R0组),细菌多样性指数 H' 、 E' 和 $1/D$ 均增大;恢复喂食2周后,肠道壁菌群结构逐渐恢复,T-RF 496 bp的相对丰度逐渐上升到55.49%±8.37%(S2R2组),3个多样性指数均减小至原有水平;总的说来, γ -变形菌纲是花鲈肠道的最主要细菌群。可见利用T-RFLP技术可以很好地分析花鲈肠道菌群的多样性,本实验为下一步研究花鲈肠道细菌的功能提供了基础资料,这也为研究其他鱼类的肠道菌群多样性提供了一种方法。

参考文献:

- [1] 宋增福,吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474.
Song Z F, Wu T X. Review on intestinal normal microflora in fish [J]. Fisheries Science, 2007, 26(8): 471-474 (in Chinese).
- [2] 周志刚,石鹏君,姚斌,等. 海水鱼消化道菌群结构研究进展[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 123-131.
Zhou Z G, Shi P J, Yao B, et al. A review of the microflora structure in the digestive tract of marine

- finfish [J]. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5): 123-131 (in Chinese).
- [3] 钱云霞. 饥饿对养殖花鲈蛋白酶活力的影响[J]. *水产科学*, 2002, 21(3): 6-7.
- Qian Y X. Effect of starvation on protease activities of cultured *Laterolibrax japonicus* [J]. *Fisheries Science*, 2002, 21(3): 6-7 (in Chinese).
- [4] 宋海霞, 翁幼竹, 方琼珊, 等. 斜带石斑鱼幼鱼饥饿前后胃肠道的组织学研究[J]. *台湾海峡*, 2008, 27(1): 74-78.
- Song H X, Weng Y Z, Fang Q S, *et al.* Studies on the histological changes in gastro intestinal tract of Juvenile *Epinephelus coioides* by starvation [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2008, 27(1): 74-78 (in Chinese).
- [5] 关胜军, 吴锐全, 谢骏, 等. 饥饿对大口黑鲈消化器官、蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. *南方水产*, 2007, 3(2): 25-29.
- Guan S J, Wu R Q, Xie J, *et al.* Effects of starvation on digestive organs and activities of protease and amylase of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(2): 25-29 (in Chinese).
- [6] 王爱民, 方永清, 韦信键, 等. 饥饿胁迫对鲤肠道与肝脏蛋白酶和淀粉酶活性的影响[J]. *水生态学杂志*, 2009, 2(6): 94-97.
- Wang A M, Fang Y Q, Wei X J, *et al.* Effect of starvation stress on the activity of protease and amylase in intestine and hepatopancreas of *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(6): 94-97 (in Chinese).
- [7] 乔秋实, 徐维娜, 朱浩, 等. 饥饿再投喂对团头鲂生长、体组成及肠道消化酶的影响[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(2): 63-68.
- Qiao Q S, Xu W N, Zhu H, *et al.* Effects of starvation-and-refeeding on the growth, body composition and intestinal digestive enzyme of *Megalobrama amblycephala* Yih [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(2): 63-68 (in Chinese).
- [8] Dhanasiri A K S, Brunvold L, Brinchmann M F, *et al.* Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing [J]. *Microbial Ecology*, 2011, 61(1): 20-30.
- [9] 李星浩, 颜庆云, 胡红娟, 等. 异育银鲫消化道微生物群落对恢复投喂的响应[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(5): 854-859.
- Li X H, Yan Q Y, Hu H J, *et al.* Effects of refeeding on the diversity of intestinal microflora in allogynogenetic crucial carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(5): 854-859 (in Chinese).
- [10] 裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物细菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(2): 483-491.
- Qiu Q F, Zhang D M, Ye X S, *et al.* The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 483-491 (in Chinese).
- [11] Abdo Z, Schüette U M E, Bent S J, *et al.* Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(5): 929-938.
- [12] Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, *et al.* Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(3): 829-841.
- [13] 郁二蒙, 张振男, 夏耘, 等. 摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 118-126.
- Yu E M, Zhang Z N, Xia Y, *et al.* Effects of different diets on intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 118-126 (in Chinese).
- [14] Sugita H, Enomoto A, Deguchi Y. Intestinal microflora in the fry of *Tilapia mossambica* [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48(6): 875.
- [15] Lan C C, Love D R. Molecular characterisation of bacterial community structure along the intestinal tract of zebrafish (*Danio rerio*): a pilot study [J]. *ISRN Microbiology*, 2012: 380-385.
- [16] Wu S G, Gao T H, Zheng Y Z, *et al.* Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Aquaculture*, 2010, 303(1-4): 1-7.
- [17] Huffnagle G B, Noverr M. GI microbiota and Regulation of the Immune System [M]. New York: Springer, 2008.
- [18] Kamada N, Kim Y G, Sham H P, *et al.* Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota [J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1325-1329.

- [19] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 291-295.
Zheng T L, Su J Q. The role of marine microorganisms in the occurrence and declination of red-tide [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 291-295 (in Chinese).
- [20] Kormas K A, Meziti A, Mente E, *et al.* Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*) [J]. Microbiology Open, 2014, 3(5): 718-728.
- [21] Zhou Z G, Liu Y C, Shi P J, *et al.* Molecular characterization of the autochthonous microbiota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages [J]. Aquaculture, 2009, 286(3-4): 184-189.
- [22] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, *et al.* Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. The ISME Journal, 2011, 5(10): 1595-1608.
- [23] Bowman J P, McCuaig R D. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2463-2483.
- [24] Kim D H, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(6): 1654-1664.
- [25] Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, *et al.* Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4974-4984.

Effects of fasting and refeeding on *Lateolabrax japonicus* intestinal microflora diversity

PAN Yanyan, GU Xiaoying, ZHANG Demin, QIAN Yunxia*

(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Microflora in fish digestive tract play important roles in digestion, absorption, immunity and organ development. In this study, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique was employed to examine the changes in structure of the intestinal microbiota of *L. japonicus* after fasting and refeeding. The results showed that microflora structure of *Lateolabrax japonicus* intestinal wall changed after 2 weeks of fasting. The main T-RFs that caused the microflora structure differences among fasting group, refeeding groups and control groups were T-RFs 496 bp, 437 bp, 450 bp and 155 bp. Especially, after 2 weeks of fasting, the relative abundance of T-RF 496 bp (*Escherichia*) reduced to 21.25%±9.97% from 43.11%±3.95% of the beginning (C0) and the bacterial diversity index (H' , E' and $1/D$) of intestinal wall increased significantly compared with control groups. Bacterial diversity index (H' , E' and $1/D$) of intestinal wall were decreased and the microflora structure was recovered gradually with the refeeding. Meanwhile, the relative abundance of T-RF 496 bp gradually increased to 55.49%±8.37%. The results also indicated that the microflora structure of intestinal walls was different from that of intestinal contents, but their main phyla were the same, namely, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; fasting; refeeding; intestinal microflora; T-RFLP

Corresponding author: QIAN Yunxia. E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA092001); Zhejiang Open Foundation of the Most Important Subjects (xkzsc1513)