

摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析

郁二蒙¹, 张振男^{1,2}, 夏 耘¹, 谢 骏^{1*}, 王广军¹, 余德光¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了探究投喂冰鲜杂鱼和人工配合饲料对大口黑鲈肠道菌群的影响, 本研究采用变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)对摄食不同饵料的 2 组鲈鱼肠道内容物的细菌群落结构进行了比较分析。结果显示, 冰鲜组与饲料组的大口黑鲈肠道菌群组成相似性较低(相似性 24%), 且冰鲜组肠道菌群多样性高于饲料组。对 2 组大口黑鲈中共有条带和特异性条带进一步测序分析显示, 2 组大口黑鲈肠道共有菌有红螺菌、梭菌、保科爱德华菌、嗜麦芽窄食单胞菌和蓝细菌。冰鲜组大口黑鲈肠道中的特异性菌归属为拟杆菌、肉食杆菌、魏斯氏菌和邻单胞菌; 饲料组大口黑鲈肠道中的特异性菌归属为黄杆菌、鲸杆菌、柠檬明串珠菌、缺陷短波单胞菌。研究表明, 与投喂冰鲜杂鱼的大口黑鲈相比, 人工配合饲料降低了大口黑鲈肠道菌群多样性, 也抑制了拟杆菌等有益菌在大口黑鲈肠道内的分布。推测饲料组大口黑鲈生长较慢可能与其肠道菌群中拟杆菌与厚壁菌的比值下降有关。研究结果提示, 在今后大口黑鲈养殖或者人工配合饲料研制过程中, 添加拟杆菌等益生菌也许可促进大口黑鲈的生长和营养吸收。

关键词: 大口黑鲈; 肠道菌群; 人工配合饲料; 冰鲜杂鱼

中图分类号: Q 938.1; S 963.7

文献标志码: A

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 属鲈形目(Perciformes)、太阳鱼科(Centrachidae), 原产于美国加利福尼亚州密西西比河水系, 是一种肉质鲜美、抗病力强、生长迅速、易起捕、适温较广的名贵肉食性鱼类, 我国广东省于 1983 年引进大口黑鲈鱼苗, 并于 1985 年人工繁殖成功^[1]。目前, 我国大口黑鲈的年产量已达到 16 万 t, 现已成为我国重要的名优淡水养殖鱼类之一^[2]。尽管大口黑鲈养殖已经形成规模性产业, 但是目前养殖生产仍然主要依赖冰鲜杂鱼作为直接饵料; 源自近海的冰鲜杂鱼的长期使用, 不仅造成了资源浪费, 而且更为严重的是一些原本是海洋中的致病微生物可能沿此途径传入淡水养殖区域, 例如引起大口黑鲈严重病害流行的虹彩病毒(*Ranavirus*)疾病的暴发极可能是因为冰

鲜饵料的投喂而传入的病原^[3]。大口黑鲈人工配合饲料取代冰鲜杂鱼投喂是产业发展的必然趋势, 但是事实上, 大口黑鲈饲料已经推广多年, 进展十分缓慢。以往关于摄食人工配合饲料对大口黑鲈的影响研究主要集中在生长性能^[4-6]、肌肉营养成分^[4-5,7]、血清免疫指标^[4]和肠道蛋白酶活性^[6]等方面。已有研究表明, 鱼类饲料需求或营养需求与鱼类肠道菌群的组成密切相关^[8-9]。饲料的差异也影响了鱼类肠道菌群的组成和鱼体肠道的健康状况^[10-11], 如摄食植物的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠道内厚壁菌占优势、而摄食海产品的虹鳟肠道内变形菌占优势^[8], 摄食人工饲料与浮萍(*Lemna minor* L.)对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肠道菌群的影响较大^[9]、草鱼肠道内有益菌的增加促进了白细胞的

收稿日期:2014-07-28 修回日期:2014-11-04

资助项目:“十二五”农村领域国家科技计划(2012BAD25B04);公益性行业(农业)科研专项(201203083)

通信作者:谢 骏, E-mail: xiejunhy@hotmail.com

吞噬百分比和吞噬指数的上升^[10]。因此从大口黑鲈肠道菌群结构层面了解大口黑鲈营养需求与饲料配置是一种有价值的新探索。

变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE 技术)是一种基于 16S rDNA 基因的技术,该技术在研究微生物多样性和种群差异上已成为一种重要的工具,其避免了传统微生物研究方法的局限性,目前已经被成功应用于研究鱼类肠道菌群组成结构^[12]。本研究将采用 PCR-DGGE 技术分别构建冰鲜组和人工配合饲料组的大口黑鲈肠道菌群的 PCR-DGGE 图谱,分析图谱中共性条带与特异性条带的克隆测序结果,探讨人工配合饲料对大口黑鲈肠道微生物的影响,旨在为大口黑鲈人工配合饲料的开发与利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在广东省佛山地区选择 4 口池塘(面积均为 0.4 公顷左右,有效水深 2.6 m),按 467 条/公顷的密度投放规格为 5~6 cm 的大口黑鲈(180 条/500 g),2 口池塘投喂人工配合饲料,另 2 口池塘投喂冰鲜杂鱼。除饲料外,池塘的水源、日常管理方式均相同,水温 26~30 °C,透明度 32~38 cm, pH 值 8.0~8.5,溶解氧为 4.8~9.3 mg/L,每天上、下午各投喂 1 次。养殖 3 个月后,采集 24 尾大口黑鲈,其中从 2 口冰鲜组池塘里分别取 6 尾,共 12 尾[均重(151.0±6.8)g];从 2 口人工配合饲料组池塘里也分别取 6 尾,共 12 尾[均重(123.0±10.7)g]。实验用冰鲜杂鱼为冰冻的蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*),冰鲜杂鱼和人工配合饲料的主要营养成分见表 1。

表 1 人工配合饲料和冰鲜杂鱼的营养组分

Tab.1 The composition of artificial diet and

营养成分 composition	iced trash fish %	
	人工配合饲料 artificial diet	冰鲜杂鱼 ^[13] iced trash fish
粗蛋白 crude protein	43.0	20.0
粗脂肪 crude fat	6.0	4.4
粗纤维 crude fiber	5.0	0.6
灰分 ash	15.0	4.7
水份 moisture	12.0	64.3

1.2 样品制备

用解剖剪沿肛门向上朝前呈弧形剪开,打开腹腔,用无菌棉线结扎前肠和肛门处,将肠道剪下后取出,置于酒精消毒过的解剖盘,用酒精棉球擦拭肠管外壁,接着用无菌生理盐水冲洗,5 mL EP 管均匀收集肠道内容物,将样品置于 -20 °C 保存备用。

1.3 肠道细菌总 DNA 的提取

肠道细菌总 DNA 的提取采用 Stool MiniKit 试剂盒(Omega,美国),具体步骤参照该试剂盒说明。DNA 提取后用 1% 琼脂糖检测, -20 °C 保存备用。

1.4 目的片段 PCR 扩增及纯化

根据细菌 16S rDNA V3 可变区设计 1 对通用引物,其中在上游引物的 5'-末端添加 1 个约 40 bp 的 GC 发夹结构,引物 V338F-GC:5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGGG ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'; V534R:5'-ATTAC CGCGG CTGCT GG-3',由上海英骏生物工程公司合成。使用引物 V338F-GC 和 V534R 对草鱼肠道细菌总 DNA 进行 PCR 扩增,反应体系:dNTP Mixture (10 mmol/L)1 μL,10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺)5 μL, V338F(20 nmol/μL)1 μL, V534R(20 nmol/μL)1 μL, Taq 酶(5 U/μL)0.5 μL,模板 DNA 1 μL,加双蒸水至 50 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,65~55 °C 退火 30 s(每个循环降 0.5 °C),72 °C 延伸 1 min,20 个循环;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,10 个循环;72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖检测电泳产物。采用 Omega Gel Extraction Kit(美国)对 PCR 产物进行回收纯化。

1.5 DGGE 成像与分析

DGGE 用 10% (M/V) 聚丙烯酰胺凝胶 (acrylamide/bisacrylamide 为 37.5:1),变性剂线性梯度范围为 35%~55% (100% 变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),缓冲液为 1 × TAE Buffer (40 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L 醋酸钠,1.0 mmol/L Na₂-EDTA),PCR 产物采用 Bio-Rad D Code™ 突变检测系统(美国)进行分离。电泳条件:温度为 60 °C,首先在 200 V 电压下预电泳 5 min,然后在 80 V 电压下电泳 12 h。

1.6 目的条带的回收、克隆和测序

将肠道菌群 DGGE 图谱中清晰的共性和特异条带进行标记割胶回收,加入 TE (pH 8.0) 浸泡过夜,取上清液作模板进行扩增。所用引物: V338F:5'-ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'; V534R:5'-ATTAC CGCGG CTGCT GG-3'。PCR 反应体系:dNTP Mixture(10 mmol/L)1 μ L,10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+})5 μ L,上、下游引物(20 nmol/ μ L)各 1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,模板 DNA 1 μ L,加双蒸水至 50 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,65~55 $^{\circ}$ C 退火 30 s(每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,20 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,10 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 OMEGA 试剂盒纯化的 PCR 产物与载体 pMD19-T 连接,热激转化 *Escherichia coli* JM109

感受态细胞。以氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性平板进行培养,挑选阳性克隆,菌落 PCR 检测确认阳性克隆。阳性样品送上海英骏公司测序。

2 结果

2.1 饲料组与冰鲜组大口黑鲈肠道菌群 DGGE 图谱建立

对 2 组大口黑鲈肠道细菌的 16S rDNA V3 片段进行 PCR 扩增后构建肠道菌群 DGGE 图谱。本实验图中,2 组间条带的数量、亮度和位置均存在差异,DGGE 图谱可以较好地反映出 2 组大口黑鲈肠道菌群组成结构的异同之处。图 1 和图 2 为 2 组大口黑鲈肠道菌群 DGGE 图谱,图中有 28 个条带(Band1-Band28)较为明显且可以鉴别,其中冰鲜组可鉴别条带为 20 条,饲料组为 15 条(2 组含有 7 条共有条带)。

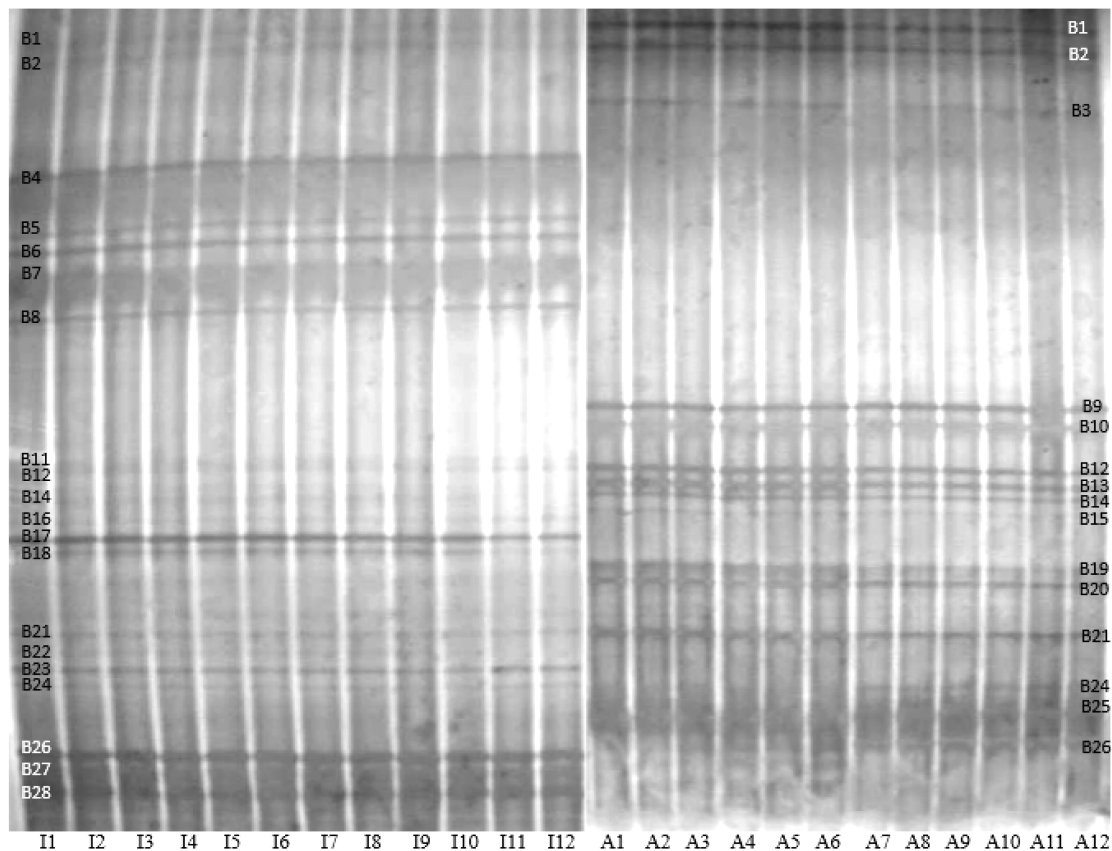


图 1 2 组大口黑鲈肠道菌群的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱

I1~I12:冰鲜组;A1~A12:饲料组,下同。条带 B1~B28 代表较为明显的可鉴别细菌,详见表 2

Fig. 1 DGGE profile of intestinal microflora of both groups of largemouth bass

I1-I12:iced trash fish group; A1-A12:artificial diet group, the same below. The bands from B1 to B28 represent identifiable bacterias which are distinct,details as per table 2

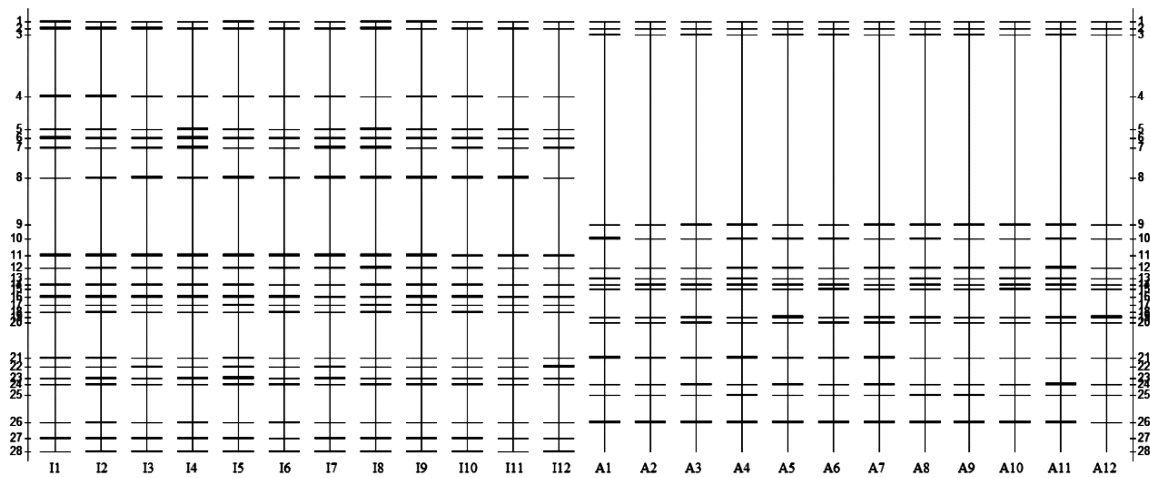


图2 2组大口黑鲈肠道菌群的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离简图

Fig. 2 DGGE profile of intestinal microflora of both groups of largemouth bass

基于大口黑鲈肠道菌群变性梯度凝胶电泳(DGGE)示意图,利用 BIO-RAD Quantity One 4.3.1进一步分析冰鲜组与饲料组的相似性。在相似性 0.24 处分开为 2 条主枝干,一条是冰鲜

组,另一条是饲料组,表明 2 组实验鱼间肠道菌群的组成结构存在明显差异,而组内各重复相似性很高(图 3)。

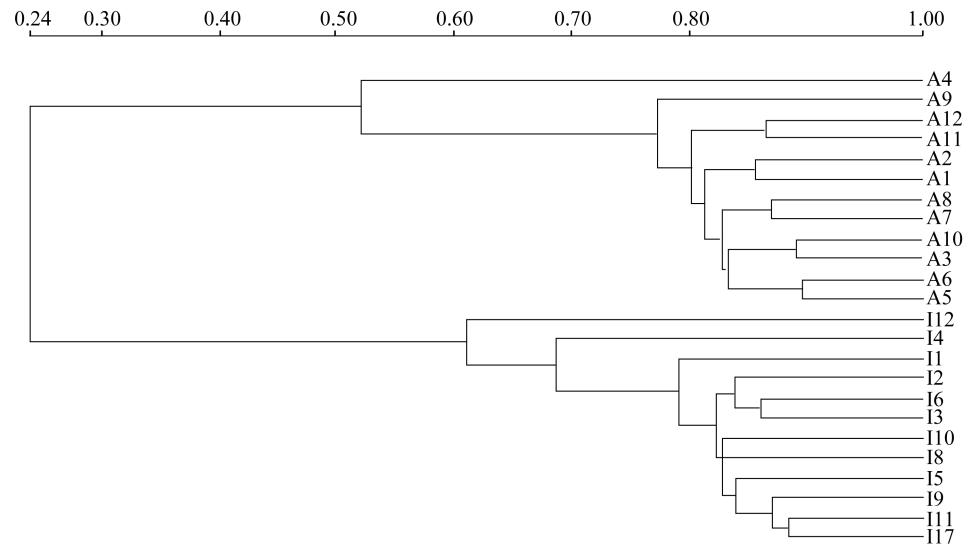


图3 2组大口黑鲈肠道菌群的变性梯度(DGGE)图谱聚类分析图

Fig. 3 Clustering analysis of DGGE profile of intestinal microflora of both groups of largemouth bass

2.2 DGGE 目的条带基因片段的切割克隆、测序及序列比对结果分析

大口黑鲈肠道内容物 DGGE 图谱的可分辨条带经分离切割后,进行克隆测序,将所测得的序列用 BLAST 程序进行相似性比较。所比对的序列与数据库中序列的相似性范围在 97%~100%,其中有 18 条序列的相似性为 100%,有 14 条序列为未培养细菌(表 2)。

3 讨论

本研究中,饲料组与冰鲜组之间肠道菌群组成相似性较低,且饲料组肠道菌群多样性低于冰鲜组,表明投喂人工配合饲料改变了大口黑鲈肠道菌群的组成。已有研究表明,鱼类肠道菌群组成与其所摄食的饵料有很大相关性^[8,14],目前大口黑鲈饲料是经过高温制粒的膨化饲料,制粒过

表 2 大口黑鲈肠道菌群 DGGE 目的条带的克隆测序结果
 Tab. 2 The sequencing results of the DGGE purpose bands from intestinal microflora of largemouth bass

条带类型 band types	条带号 band name	Genbank 数据库中比对最相近的菌种名称 closest relatives found in the Genbank database	相似性/% similarity
共有条带 common bands	band 1	Rhodospirillaceae bacterium 红螺菌科细菌	99
	band 2	uncultured bacterium 未培养细菌	100
	band 12	<i>Clostridium</i> sp. bacterium 梭菌属细菌	100
	band 14	uncultured bacterium 未培养细菌	98
	band 21	<i>Edwardsiella hoshinae</i> 保科爱德华菌	100
	band 24 - 1	uncultured bacterium 未培养细菌	99
	band 24 - 2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 嗜麦芽窄食单胞菌	100
	band 24 - 4	uncultured bacterium 未培养细菌	99
	band 26	<i>Cyanobacterium</i> 蓝细菌	100
冰鲜组特异性条带 specific bands in iced trash fish group	band 4	uncultured bacterium 未培养细菌	99
	band 5	uncultured bacterium 未培养细菌	100
	band 6 - 1	<i>Clostridium</i> sp. bacterium 梭菌属细菌	99
	band 6 - 2	Alphaproteobacterium α -变形菌纲细菌	100
	band 7 - 1	<i>Plesiomonas Shigelloides</i> 类志贺邻单胞菌	100
	band 7 - 3	uncultured bacterium 未培养细菌	98
	band 8 - 1	<i>Weissella</i> sp. bacterium 魏斯氏菌属细菌	100
	band 8 - 2	<i>Carnobacterium</i> sp. bacterium 肉食杆菌属细菌	100
	band 8 - 4	<i>Plesiomonas</i> sp. bacterium 邻单胞菌属细菌	100
	band 11	<i>Plesiomonas</i> sp. bacterium 邻单胞菌属细菌	100
	band 16	uncultured bacterium 未培养细菌	99
	band 17	uncultured bacterium 未培养细菌	100
	band 18	<i>Bacteroides</i> sp. bacterium 拟杆菌属细菌	99
	band 22 - 1	uncultured bacterium 未培养细菌	97
band 22 - 2	uncultured bacterium 未培养细菌	97	
饲料组特异性条带 specific bands in artificial diet group	band 23	Clostridia bacterium 梭菌纲细菌	99
	band 3	<i>Clostridium</i> sp. bacterium 梭菌属细菌	99
	band 9	<i>Brevundimonas diminuta</i> 缺陷短波单胞菌	100
	band 10	<i>Cetobacterium somerae</i> 鲸杆菌	100
	band 13	<i>Flavobacterium</i> sp. bacterium 黄杆菌属细菌	100
	band 15	<i>Chlamydia</i> 衣原体	98
	band 19	<i>Leuconostoc citreum</i> 柠檬明串珠菌	100
	band 20	<i>Clostridium</i> sp. bacterium 梭菌属细菌	100
	band 25 - 1	uncultured bacterium 未培养细菌	99
	band 25 - 3	uncultured bacterium 未培养细菌	99

程中高温、高压导致大多数微生物无法生存,而冰鲜杂鱼尽管经过捕捞、运输、冷藏等过程,但其所携带的大部分微生物仍处于可生存环境之下^[2],推测人工配合饲料所含有的细菌多样性相对于冰鲜饵料较低,进而导致摄食人工饲料的大口黑鲈肠道内细菌多样性低于冰鲜组。

2 组大口黑鲈肠道共有菌有红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*)、梭菌属 (*Clostridium*)、保科

爱德华菌 (*E. hoshinae*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*S. maltophilia*) 和蓝细菌 (*Cyanobacterium*)。红螺菌科隶属变形菌门 (*Proteobacteria*)、 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*)、红螺菌目 (*Rhodospirillales*), 是淡水水体和淡水鱼类常见的微生物类群^[15-16]。梭菌属是 2 组实验鱼共有的优势菌, 属于厚壁菌门 (*Firmicutes*)、梭菌纲 (*Clostridia*)、梭菌目 (*Clostridiales*)、梭菌科

(Clostridiaceae),有报道称肉食性鱼类肠道内含有较多的梭菌属等细菌^[17]。

拟杆菌属(*Bacteroides*)是冰鲜组大口黑鲈肠道的特异性细菌之一,拟杆菌在帮助宿主分解营养物质、提高营养利用率^[18]及维持肠道微生态平衡^[19]等方面均有着重要作用。前期研究发现,拟杆菌的数量多少与人(*Homo sapiens*)、猪(*Sus scrofa*)的脂肪含量密切相关^[20-21]。更有研究明确指出,肠道内拟杆菌与厚壁菌的比例直接影响体内的脂肪积累和动物肥胖^[22],肥胖时脂肪积累主要与厚壁菌增加有关,而健康动物的肠道则是“拟杆菌门”的细菌较多。研究发现摄食人工配合饲料的大口黑鲈增重率显著低于摄食冰鲜饵料的大口黑鲈,常常出现脂肪肝现象^[5],本研究中,仅在冰鲜组中检测出拟杆菌,推测冰鲜杂鱼中可能含有较多此类细菌或者冰鲜杂鱼的营养成分适合此类细菌在大口黑鲈肠道中定植,推测饲料组大口黑鲈生长较慢可能与其肠道菌群中拟杆菌与厚壁菌的比值下降有关。冰鲜组大口黑鲈肠道中的特异性菌还包括肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和邻单胞菌属(*Plesiomonas*)。肉食杆菌和魏斯氏菌均是肉质贮藏时常出现的腐败菌^[23-24],该类群细菌的出现可能是由于冰鲜放置时间过久或贮藏时受污染所致。邻单胞菌属是养殖水体和淡水鱼体中常见的细菌,其中的类志贺邻单胞菌(*P. shigelloides*)则是可引起人类肠胃疾病的病原菌^[25],此类菌的携带可能与冰鲜的来源有关。

饲料组大口黑鲈肠道中的特异性细菌归属为黄杆菌属(*Flavobacterium*)、鲸杆菌(*C. somerae*)、柠檬明串珠菌(*L. citreum*)、缺陷短波单胞菌(*B. diminuta*)和衣原体(*Chlamydia*)。已有研究发现,在大口黑鲈肠道中分离出的23个可鉴别菌株中,有7个属于黄杆菌属^[26],至于该属细菌对大口黑鲈的生长、新陈代谢的作用,还有待于进一步研究。鲸杆菌是产维生素B₁₂的主要细菌^[27],本研究中鲸杆菌的含量增加可能有助于人工配合饲料组大口黑鲈对维生素B₁₂的需求和利用,也提示大口黑鲈膨化饲料维生素缺乏会导致鱼类自身弥补的代偿增加。

池塘中微生态结构也会影响大口黑鲈肠道菌群组成。如饲料的差异等因素导致养殖水体中碳、氮、磷等营养成分的不同^[28-29],而这些不同的

营养成分将进一步影响水体中微生物群落的组成结构^[30]。水体所携带的细菌会通过口腔和鳃进入鱼体的消化道内,并与宿主体内的原有细菌通过不断竞争保持动态平衡^[17]。本研究中大口黑鲈肠道内的共有菌或差异菌可能来自于池塘水体中细菌,如2组大口黑鲈肠道共有的红螺菌和蓝细菌皆属于光合细菌,而光合细菌是水体中重要的微生物类群,它们是维持水环境微生态平衡、预防水生动物疾病的重要菌^[15]。近年养殖过程中,养殖户普遍使用光合细菌进行池塘泼洒和饵料拌喂,但红螺菌是来自人工投喂或自然环境有待进一步研究。

总之,饲料组大口黑鲈肠道菌群多样性减少,可能是因为人工配合饲料的营养成分无法满足鱼体及其肠道内土著细菌的生长需求,今后的养殖实践可以向人工配合饲料中添加有利于大口黑鲈肠道健康的益生菌,以促进大口黑鲈的生长。

参考文献:

- [1] Chen Y J, Liu Y J, Yang H J, et al. Effect of dietary oxidized fish oil on growth performance, body composition, antioxidant defence mechanism and liver histology of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(3): 321-331.
- [2] Ding Q Q, Chen Y H, Cao S J, et al. The research progress for nutritional requirements of *Micropterus salmoides* [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2013, 9(11): 38-43. [丁庆秋,陈宇航,曹双俊,等.大口黑鲈的营养需求研究进展. *养殖与饲料*, 2013, 9(11): 38-43.]
- [3] Deng G C, Li S J, Xie J, et al. Characterization of a ranavirus isolated from ulcerative syndrome infected largemouth bass *Micropterus salmoides* in China [J]. *Aquaculture*, 2011, 310(2): 274-280.
- [4] Chen N S, Liang Q L, Xiao W W, et al. Effect of supplementing eaa to lower protein diets on growth, body composition and immunological index of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(2): 262-271. [陈乃松,梁勤朗,肖温温,等.在低蛋白质饲料中补充必需氨基酸对大口黑鲈生长、体组成和免疫指标的影响. *水生生物学报*, 2014, 38(2): 262-271.]
- [5] Zhang L, Xu G H, Guo H Q, et al. Effect of different feeding stuff on growth performance and body biochemical composition of *Micropterus salmoides*

- [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(6): 60 - 63. [张丽, 许国焕, 郭慧青, 等. 摄食不同饵料对加州鲈生长性能及体成分的影响. *淡水渔业*, 2011, 41(6): 60 - 63.]
- [6] Guan S J, Wu R Q, Xie J, *et al.* Effect of different feeding stuff on growth performance, index of the digestive tract and digestive enzyme activity of *Micropterus salmoides* [J]. *Feed Industry*, 2007, 28(2): 32 - 36. [关胜军, 吴锐全, 谢骏, 等. 两种饲料对大口黑鲈生长, 消化道指数和消化酶活性的影响. *饲料工业*, 2007, 28(2): 32 - 36.]
- [7] Wang G J, Guan S J, Wu R Q, *et al.* Analysis and evaluation on nutritional composition in muscles of big mouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Marine Fisheries*, 2008, 30(3): 239 - 244. [王广军, 关胜军, 吴锐全, 等. 大口黑鲈肌肉营养成分分析及营养评价. *海洋渔业*, 2008, 30(3): 239 - 244.]
- [8] Ingerslev H C, Jørgensen L von G, Strube M L, *et al.* The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type [J]. *Aquaculture*, 2014, 424 - 425: 2434.
- [9] Zhou W H, Chen X X, Zhang D X, *et al.* A preliminary study on the influence of different feeding stuff on intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1998, 17(3): 252 - 256. [周文豪, 陈孝焯, 张冬晓, 等. 摄食不同饵料对草鱼肠道菌群影响的研究. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 252 - 256.]
- [10] Li L. Relations between changes of intestinal microflora and immune function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [D]. Wuhan: *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2003. [李莉. 草鱼肠道菌群的变化和免疫机能的关系. 武汉: 华中农业大学, 2003.]
- [11] Reveco F E, Øverland M, Romarheim O H, *et al.* Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 2014, 420 - 421: 262 - 269.
- [12] Muchlisin Z A. *Aquaculture* [M]. InTech, Rijeka, 2012.
- [13] Zhu Z M, Ma D M, Bai J J, *et al.* Effects of formulated diets and frozen trash fish on growth and expression of LPL gene mRNA in largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2014, 29(4): 360 - 363. [朱择敏, 马冬梅, 白俊杰, 等. 配合饲料、冰鲜杂鱼对大口黑鲈生长和 LPL 基因 mRNA 表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(4): 360 - 363.]
- [14] Mansfield G S, Desai A R, Nilson S A, *et al.* Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system [J]. *Aquaculture*, 2010, 307(1 - 2): 95 - 104.
- [15] Kim J K, Lee B K. Mass production of *Rhodospseudomonas palustris* as diet for aquaculture [J]. *Aquacultural Engineering*, 2000, 23(4): 281 - 293.
- [16] Qiu H D, Xu S N, Zhu H, *et al.* The influence of salt resistant *Rhodospirillaceae* bacteria on the water quality and bacterial population in the freshwater fish-ponds [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 231 - 236. [邱宏端, 徐姗楠, 朱航, 等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响. *水产学报*, 2002, 26(3): 231 - 236.]
- [17] Lv X R, Xiao K Y. The current research of intestinal microflora of fish [J]. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 2008, 2: 12 - 18. [吕欣荣, 肖克宇. 鱼类肠道菌群的研究现状. *江西水产科技*, 2008, 2: 12 - 18.]
- [18] Bäckhed F, Ding H, Wang T, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718 - 15723.
- [19] Sears C L. A dynamic partnership: celebrating our gut flora [J]. *Anaerobe*, 2005, 11(5): 247 - 251.
- [20] Bäckhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915 - 1920.
- [21] Zhang L P, Wang K N. Establishment and application of fluorescence quantitative PCR for detecting swine *Bacteroides-Prevotella* population [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 7: 50 - 54. [张丽萍, 王康宁. 不同品种猪肠道拟杆菌属 - 普雷沃氏菌属群实时荧光定量分析. *中国畜牧杂志*, 2009, 7: 50 - 54.]
- [22] Ley R E, Turnbaugh P J, Klein S, *et al.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022 - 1023.
- [23] Comi G, Iacumin L. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham [J].

- International Journal of Food Science & Technology, 2012,47(1):114-121.
- [24] Leisner J J, Laursen B G, Prévost H, *et al.* Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(5):592-613.
- [25] Chen X, Chen Y, Yang Q, *et al.* Plesiomonas shigelloides Infection in Southeast China [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e77877.
- [26] Huang W F, Pang Q H, Li X B, *et al.* Study on the stomachic and intestinal partied oxybiontic microflora of *Micropterus salmoides* [J]. Journal of South China Normal University: Natural Science Edition, 2002 (4):10-14. [黄文芳, 庞启华, 李小波, 等. 从大口黑鲈胃、肠道中分离的部分好氧菌的研究. 华南师范大学学报:自然科学版, 2002(4):10-14.]
- [27] Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. The vitamin B₁₂-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish [J]. Aquaculture, 1991, 92:267-276.
- [28] Cho C Y, Bureau D. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture [J]. Aquaculture Research, 2001, 32(s1):349-360.
- [29] Thompson K R, Muzinic L A, Engler L S, *et al.* Effects of feeding practical diets containing various protein levels on growth, survival, body composition, and processing traits of Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and on pond water quality [J]. Aquaculture Research, 2004, 35(7):647-659.
- [30] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P, *et al.* Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize [J]. Aquaculture, 2003, 219(1-4):393-411.

Effects of different diets on intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

YU Ermeng¹, ZHANG Zhennan^{1,2}, XIA Yun¹, XIE Jun^{1*}, WANG Guangjun¹, YU Deguang¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) has become one of the important famous freshwater fishes in China since the success of their artificial breeding in 1985. However, iced trash fish from offshore is still the main feed during the culture process of largemouth bass, and long-term use of iced trash fish not only puts pressure on the resources and environment, but also brings some of the original ocean pathogenic microorganisms into freshwater aquaculture area. Replacement of iced trash fish by artificial feed is an inevitable trend in the industrial development of largemouth bass, but in fact, the progress of extensive use of artificial feed has been slow. It's reported that demand for fish feed or nutrition is closely related to composition of the intestinal flora of fish, and differences of fish diets also affect the composition of fish intestinal microflora. So, to explore the nutritional needs and feed configuration of largemouth bass, based on intestinal microflora, is a valuable new exploration. In this paper, intestinal microflora of different largemouth bass including feeding iced trash fish and artificial diet were examined to assess intestinal bacteria community structure using the technology of PCR-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The results showed that, microflora composition similarity between iced trash fish group and artificial diet group was 24%. Compared with the iced trash fish group, the diversity of intestinal microflora of artificial diet group decreased. The analysis of the common and specific bands from two groups of largemouth bass demonstrated that, the common intestinal bacteria of both groups include Rhodospirillaceae, *Clostridium*, *Cyanobacterium*, *Edwardsiella hoshinae* and *Stenotrophomonas maltophilia*; the specific intestinal bacteria of iced trash fish group were *Bacteroides*, *Carnobacterium*, *Weissella* and *Plesiomonas*; the specific intestinal bacteria of artificial diet group were *Flavobacterium*, *Cetobacterium somerae*, *Leuconostoc citreum*, *Brevundimonas diminuta*. In sum, compared with iced trash fish, artificial diet reduced the diversity of intestinal microflora and also inhibited the quantity of probiotics of largemouth bass. It's speculated that slower growth of largemouth bass feeding artificial diet may be related to the decline in the ratio of *Bacteroides* to Firmicutes. The results of this study suggested that, in the future, the probiotics such as *Bacteroides* could be added to artificial diet for improving absorption of artificial diet, and further promoting the growth and nutritional absorption of largemouth bass.

Key words: *Micropterus salmoides*; intestinal microflora; artificial diet; iced trash fish

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiejunhy@hotmail.com