

野生与养殖银鲳消化道菌群结构中产酶菌的对比分析

王建建^{1,2}, 高权新¹, 张晨捷¹, 彭士明¹, 王建钢¹, 施兆鸿^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室,上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 实验对野生和养殖银鲳胃、幽门盲囊、前肠、中肠、后肠菌群结构进行了定性对比分析,并对产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶的菌株进行了鉴定。结果发现,野生和养殖种群的消化道菌群结构存在较大差异,且同一种群消化道各部分之间菌群结构也存在较大差异。尽管养殖和野生银鲳均在幽门盲囊中具有最多的可培养细菌菌株,但野生银鲳消化道内主要菌群为嗜冷菌属(*Psychrobacter*)和*Pseudochrobacterum*,养殖银鲳消化道主要菌群为不动杆菌属(*Acinetobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),两种群共有细菌仅一株,即*Psychrobacter piscatorii* strain VSD503,但其分别存在于野生与养殖种群银鲳消化道的不同部位。在产酶菌株筛选中发现,野生银鲳消化道内分离到 16 株产酶菌,其中 44% 可培养菌能产蛋白酶,56% 能产淀粉酶,11% 能产脂肪酶,56% 能产纤维素酶,部分菌株可产 2 株以上的消化酶,其中产 3 种以上酶的菌株有 5 株,且产酶量丰富。相对于野生银鲳,养殖银鲳消化道内分离到 22 株产酶菌,主要以产蛋白酶和淀粉酶为主,70% 可培养菌可产蛋白酶,21% 可产淀粉酶,仅*Bacillus thuringiensis* strain VITGS 可产纤维素酶,无一株菌产脂肪酶,其中只有*Bacillus thuringiensis* strain VITGS 产 3 种酶但产酶量相对较少。研究可为银鲳人工养殖中潜在益生菌的筛选提供理论依据。

关键词: 银鲳; 消化道菌群结构; 产酶菌; 消化酶

中图分类号: S 941

文献标志码: A

近年来,生物的肠道菌群结构对消化吸收的作用,越来越受到人们的关注^[1-2]。肠道微生物重要的功能之一是促进肠道对营养物质的消化吸收,提高饵料转化率。其发挥作用主要是通过增加肠道消化酶的活性来实现的。而鱼类消化酶可划分成通过机体自身分泌的内源性消化酶、由肠道微生物产生的外源性消化酶这两大类,将食物分解为肠道可吸收的小分子营养物质^[3-4]。内源性消化酶与鱼本身的消化系统特性、发育阶段、食物组成等有关,而外源性消化酶的活性则与定植在肠道中的菌群结构有关外,还与饲料、环境等有关。肠道菌群结构中产消化酶的菌也称之为有益菌,近几年有益菌的研究与应用也渐渐成为了研

究热点。何敏等^[5]在对重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)的研究中发现,益生菌作为肠道微生物的补充,其使用不仅提高了重口裂腹鱼的生长率,而且提高了重口裂腹鱼肠道蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的活性。赖凯昭等^[6]在对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂)的研究中发现,益生菌作为饵料添加剂可显著提高奥尼罗非鱼的生长速度及肠道蛋白酶的活性。因此,研究鱼体消化道中的菌群结构和产酶菌具有重要的实际应用价值。

银鲳(*Pampus argenteus*)是极具开发潜力的鱼种,近几年在人工养殖条件下,养殖银鲳与同期自然海区中的野生银鲳相比个体较小,生长速度

收稿日期:2014-07-29 修回日期:2014-10-01

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(东 2014Z02);国家科技支撑计划(2011BAD13B01)

通信作者:施兆鸿,E-mail:shizh@eastfishery.ac.cn

偏慢。除了养殖条件造成胁迫外^[7-9],饲料中的营养组成未达到银鲳的生长需求^[10],或银鲳对饲料不能很好地消化吸收^[11],也是限制生长的原因之一。因此开展野生银鲳与养殖银鲳肠道菌群结构的研究,有助于从营养学角度揭示养殖环境条件下银鲳生长慢的原因。而通过定性对比分析野生与养殖银鲳消化道菌群的产酶菌,可为今后人工养殖银鲳配合饲料中适宜益生菌的开发提供基础理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料鱼来源

2012年8月,从养殖池和天然海区同时取样。实验所用养殖银鲳来自东海水产研究所自行繁育的后代,野生银鲳捕自浙江六横岛附近海域。养殖银鲳的平均叉长为 (10.5 ± 0.5) cm,平均体质量为 (30 ± 5) g。野生银鲳的平均叉长为 (18 ± 0.5) cm,平均体质量为 (45 ± 5) g。养殖银鲳采用日本林兼株式会社生产的鱼宝6号料饲喂。

1.2 取样方法

养殖银鲳在取样解剖前饥饿24 h,野生银鲳暂养24 h,暂养用水取自其生存海域。从2个水体中随机各捞取15尾鱼,每3尾分为一组,解剖前进行拍照并测量其叉长和体质量。鱼体解剖在冰盘上进行,取整个肠道并用70%的酒精擦拭整个肠外壁,将其分为胃、幽门盲囊、前肠、中肠、后肠分装于无菌离心管内,将每组鱼的各消化肠段混合后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.3 16S rDNA-PCR 菌群分离鉴定

肠道菌群培养 样品用灭菌匀浆机研磨均匀,研磨样品设为 10^{-1} ,再用0.85%的生理盐水将其稀释至 10^{-8} 并震荡混匀。取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 6个稀释度样品液各50 μL 均匀涂布于LB培养基,每个样品设3个平行。涂好的平板倒置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。

肠道菌的分离 在恒温培养箱中培养24 h后,挑选不同大小、不同颜色、不同形状的菌株进行划线纯化培养24 h,再将纯化的菌接种于LB液体培养基中进行扩大培养12 h,之后将菌液保存至40%甘油培养液中,混合比例为1:1。

肠道菌群 16S rDNA 基因序列分析 将分离纯化后的菌群接种于LB固体培养基中,经24 h培养后,挑取菌落并提取DNA作为模板

(DNA提取试剂盒购自天根公司),设计引物分别扩增16S rDNA基因片段。引物为通用引物27F/1492R,由生工生物工程技术服务(上海)有限公司合成。PCR扩增条件依次如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min,30个重复。PCR产物送生工生物工程技术服务(上海)有限公司测序。将所测得的目的序列结果提交至基因数据库(GenBank),输入NCBI中进行BLAST比对,从比对结果中选择分类信息较为完整且相似度较高的序列,用于推测目的序列的分类信息,确定其物种。

1.4 产酶菌的筛选

鉴定出的菌群原保存液设为 10^{-1} ,再用0.85%的生理盐水将其稀释至 10^{-8} 并震荡混匀。取稀释样品液50 μL 均匀涂布于各消化酶筛选培养基,每个样品设3个平行。涂好的平板倒置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。

蛋白酶筛选培养基^[12]:干酪素8.0 g, Na_2HPO_4 2.0 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 5.0 g,牛肉浸出粉3.0 g,琼脂粉15 g,0.4%溴麝香草酚蓝溶液12.5 mL,蒸馏水1 000 mL, pH 7.4。培养24 h后看是否有透明菌圈产生。产酶多少以透明圈直径比菌圈直径,即 R/r (R 表示透明圈, r 表示菌圈)。下同。

淀粉酶筛选培养基^[13-14]:淀粉20 g,酵母浸出粉5.0 g,胰酪蛋白胨10 g, Na_2HPO_4 5.0 g, MgSO_4 0.1 g, NaCl 5.0 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL, pH 7.0~7.4。

培养24 h后,加入碘液,看是否有透明圈产生。碘液: I_2 0.5 g, KI 5.0 g,定容至100 mL,取1 mL再定容至100 mL。

脂肪酶筛选培养基^[15-17]:橄榄油25 mL,胰酪蛋白胨10 g,牛肉浸出粉5.0 g,葡萄糖3.0 g, PVA 10 g, NaCl 5.0 g,吐温805 mL, K_2HPO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g,琼脂15 g,中性红0.05 g,蒸馏水1 000 mL, pH 7.5。

培养24 h后观察菌圈附近是否有橙黄色变为紫红色。

纤维素酶筛选培养基^[18]: NaCl 5 g, MgSO_4 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, K_2HPO_4 2.0 g, CMC-Na 15 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g,酵母浸出粉1.0 g,胰酪蛋白胨5.0 g,蒸馏水1 000 mL,琼脂粉15 g, pH 7.0。

培养 24 h 后加入 0.5% 刚果红染色 50 min, 而后倒掉刚果红,用 5% NaCl 浸泡 1 h 后弃去 NaCl 观察是否有透明圈产生。

2 结果

2.1 PCR 结果分析

将提取的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增,获

得的片段长度为 1 300 bp 左右(图 1)。

2.2 16S rDNA 基因序列分析结果

经测序和分析得到一定长度的 16SrRNA 基因片段,与 GenBank 中已登录的基因序列比对,寻找与该菌同源性最高的菌株。野生与养殖银鲟消化道各组织菌群结构对比分析见表 1~表 5。

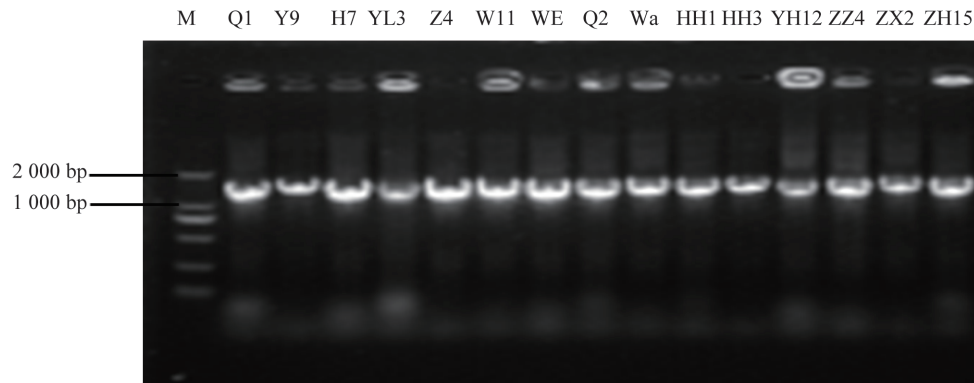


图 1 野生和养殖银鲟消化道内的部分菌群的 16SrDNA 的 PCR 产物

Fig.1 PCR products of 16SrDNA of part of the flora in the digestive tract of wild and farmed silver pomfret

表 1 野生与养殖银鲟胃菌群对比分析

Tab.1 Analysis and comparison of flora in the stomach of wild and farmed silver pomfret

实验编号 experiment	菌株 strains	相似度/% similarity	NCBI 序列号 NCBI serial number	野生种群 wild	养殖种群 farmed
H7	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain 92	99	HM212666.1	+	-
W6/Z8	<i>Psychrobacter piscatorii</i> strain VSD503	99	KC534182.1	+	-
WH13	<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain Noryt4	99	KC462924.1	+	-
WH24	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain K11A2	99	JX501674.1	+	-
WH27	<i>Psychrobacter fozii</i> strain Spedv2	99	KC462943.1	+	-
WH14	<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain D7084	99	FJ161365.1	+	-
WHf	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain HWG-A17	99	JQ684240.1	+	-
YH6	<i>Psychrobacter cibarius</i> strain JG-220	99	AY639872.1	+	-
WH11	<i>Psychrobacter fozii</i> strain NF23	99	NR_025531.1	+	-
WHb	<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain CJ-S-NA3	99	HM584287.1	+	-
YL3	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain3-6	99	JX867754.1	-	+
WL2	<i>Pseudomonas geniculata</i> strainPRRZ5	98	HQ678674.1	-	+
Z4	<i>Micrococcus luteus</i> strain PCSB6	99	HM449702.1	-	+
ww4	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain 261ZY15	99	KF831405.1	-	+
W11	<i>Pseudomonas geniculata</i> strain XJUHX-18	99	EU239476.1	-	+
WE	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> strain ALK626	99	KC456591.1	-	+
Wa	<i>Micrococcus luteus</i> strain BBN4B-01d	99	FJ357615.1	-	+
wg	<i>Micrococcus luteus</i> strain CJ-G-TSA7	99	HM584259.1	-	+

注: + 表示存在; - 表示不存在. 下表注释同此

Notes: + . presence; - . absence. The same as the following

表 2 野生与养殖银鲷幽门盲囊菌群对比分析

Tab. 2 Analysis and comparison of flora in the pyloric caeca of wild and farmed silver pomfret

实验编号 experiment	菌株 strains	相似度/% similarity	NCBI 序列号 NCBI serial number	野生种群 wild	养殖种群 farmed
Y9	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain ALK634	99	KC456599.1	+	-
Y11	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain CCUG 46016	99	NR_042474.1	+	-
W6	<i>Psychrobacter piscatorii</i> strain VSD503	99	KC534182.1	+	-
YH18	<i>Psychrobacter cibarius</i> strain LMG 7085	99	HQ698586.1	+	-
WH24	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain K11A2	99	JX501674.1	+	-
YH12	<i>Brochothrixther mospacta</i> strain KSN1	99	KC346293.1	+	-
WH27	<i>Psychrobacter fozi</i> strain Spedv2	99	KC462943.1	+	-
YHb	<i>Psychrobacter cibarius</i> strain JG-220	99	AY639872.1	+	-
WH11	<i>Psychrobacter fozi</i> strain NF23	99	NR_025531.1	+	-
YH16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Y10	99	JX646629.1	+	-
YYH7	<i>Planococcus rifietoensis</i> strain YJ-ST4	99	KF876867.1	+	-
YYH5	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> strain T-1	99	FJ493054.1	+	-
ZZH1	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain ALK635	99	KC456600.1	+	-
YYH4	<i>Psychrobacter maritimus</i> strain KOPRI_22337	99	EU000245.1	+	-
HH2	<i>Psychrobacter pulmonis</i> strain C9A2a	99	JX501673.1	+	-
YL3	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain OAct422	99	KC514127.1	-	+
YL4	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain ALK054	99	KC456561.1	-	+
YL3	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 3-6	99	JX867754.1	-	+
YL1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain Pa4	99	KF111695.1	-	+
WL2	<i>Pseudomonas geniculata</i> strain PRZ5	99	HQ678674.1	-	+
YL5	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain zzx01	99	KJ009436.1	-	+
YX14	<i>Paenibacillus typhae</i> strain xj7	99	NR_109462.1	-	+
YX8	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain RK15	99	KC790277.1	-	+
YX11	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain KLH-34	99	HM854248.1	-	+
HH2	<i>Pseudomonas putida</i> strain S-1	99	KF640247.1	-	+
YY3	<i>Pseudomonas putida</i> strain TCP2	99	JQ782510.1	-	+
YY1	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> strain MP17_2B	99	JN644620.1	-	+
HH1	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 7	100	JX867756.1	-	+
YX2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain CCNWQLS12	99	JX840377.1	-	+

表 3 野生和养殖银鲷前肠菌群对比分析

Tab. 3 Analysis and comparison of flora in the foregut of wild and farmed silver pomfret

实验编号 experiment	菌株 strains	相似度/% similarity	NCBI 序列号 NCBI serial number	野生种群 wild	养殖种群 farmed
Y11	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain CCUG 46016	99	NR_042474.1	+	-
YL3	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 3-6	99	JX867754.1	-	+
QL1	<i>Acinetobacter venetianus</i> strain IARI-CS-50	99	JF343144.1	-	+
Q2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 7N-3b	99	EU379311.1	-	+
QQ1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain AJ-G3	99	KC895498.1	-	+
QX2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain RN27	99	KC790286.1	-	+
HH2	<i>Pseudomonas putida</i> strain S-1	99	KF640247.1	-	+
Q8	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain VITWW1	99	KJ146070.1	-	+
QQ5	<i>Psychrobacter faecalis</i> strain UCL-NF 1590	99	HQ698588.1	-	+
Q1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain CW4(3)	98	JQ319535.1	-	+

表 4 野生与养殖银鲟中肠菌群对比分析
 Tab. 4 Analysis and comparison of flora in the midgut of wild and farmed silver pomfret

实验编号 experiment	菌株 strains	相似度/% similarity	NCBI 序列号 NCBI serial number	野生种群 wild	养殖种群 farmed
Y9	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain ALK634	99	KC456599.1	+	-
H7	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain 92	99	HM212666.1	+	-
WH24	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain K11A2	99	JX501674.1	+	-
ZH3	<i>Bacillus cereus</i> strain LH8	98	KC248215.1	+	-
ZH11	<i>Bacillus anthracis</i> strain TMPTTA CASMB 4	99	KF779074.1	+	-
ZH13	<i>Bacillus cereus</i> strain HN-Beihezhu1	99	JQ917438.1	+	-
ZZH1	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain ALK635	98	KC456600.1	+	-
ZH12	<i>Bacillus cereus</i> strain CP1	99	JX544748.1	+	-
ZH15	<i>Bacillus cereus</i> strain BC-3	99	KF835392.1	+	-
YL4	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain ALK054	99	KC456561.1	-	+
YL3	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 3-6	99	JX867754.1	-	+
Z4	<i>Micrococcus luteus</i> strain PCSB6	99	HM449702.1	-	+
ZX2	<i>Massilia alkalitolerans</i> strain Ka47	98	JF460770.1	-	+
QX2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain RN27	99	KC790286.1	-	+
HH2	<i>Pseudomonas putida</i> strain S-1	99	KF640247.1	-	+
ZZ4	<i>Exiguobacterium indicum</i> strain 13(BR43)	99	KF254737.1	-	+
Z11	<i>Psychrobacter celer</i> strain K-W15	99	JQ799068.1	-	+
Z8/W6	<i>Psychrobacter piscatorii</i> strain VSD503	99	KC534182.1	-	+
Z15	<i>Psychrobacter celer</i> strain U7	99	JF711008.1	-	+
ZX5	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> strain ZRS	99	JQ839143.1	-	+

表 5 野生和养殖银鲟后肠菌群对比分析
 Tab. 5 Analysis and comparison of flora in the hindgut of wild and farmed silver pomfret

实验编码 experiment	菌株 strains	相似度/% similarity	NCBI 序列号 NCBI serial number	野生种群 wild	养殖种群 farmed
H7	<i>Psychrobacter sanguinis</i> strain 92	99	HM212666.1	+	-
HH15	<i>Psychrobacter celer</i> strain Pb18	100	KF471505.1	+	-
WH13	<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain Noryt4	99	KC462924.1	+	-
YH12	<i>Brochothrix thermosphacta</i> strain KSN1	99	KC346293.1	+	-
HH22	<i>Psychrobacter fulvigenes</i> strain KC 40	99	NR_041688.1	+	-
YHb	<i>Psychrobacter cibarius</i> strain JG-220	99	AY639872.1	+	-
HH2	<i>Psychrobacter pulmonis</i> strain C9A2a	99	JX501673.1	+	-
HH7	<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4 strain 273-4	99	NR_075054.1	+	-
ZH4	<i>Bacillus cereus</i> strain OPP5 3-2	99	JQ308572.1	+	-
YL5	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain zzx01	99	KJ009436.1	-	+
HH3	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain VITGS	98	KF017270.1	-	+
QX2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain RN27	99	KC790286.1	-	+
HH2	<i>Pseudomonas putida</i> strain S-1	99	KF640247.1	-	+
HH1	<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 7	99	JX867756.1	-	+

表 6 野生与养殖银鲷消化道各组织中菌群结构数量分布
 Tab.6 Quantitative distribution of microbial community structure in the wild and farmed silver pomfret gastrointestinal tissues

菌属 strains	胃(菌株数) stomach(number)		幽门盲囊(菌株数) pyloric caeca(number)		前肠(菌株数) foregut(number)		中肠(菌株数) midgut(number)		后肠(菌株数) hindgut(umber)	
	野生 种群 wild	养殖 种群 farmed	野生 种群 wild	养殖 种群 farmed	野生 种群 wild	养殖 种群 farmed	野生 种群 wild	养殖 种群 farmed	野生 种群 wild	养殖 种群 farmed
	嗜冷菌属 <i>Psychrobacter</i>	11	-	8	-	-	1	2	5	7
<i>Pseudochrobacterum</i>	-	1	4	-	1	-	2	-	1	-
环丝菌属 <i>Brochothrix</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
动性球菌属 <i>Planococcus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	-	5	-	1	1
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	-	2	-	10	-	4	-	4	-	3
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	-	2	-	3	-	1	-	1	-	1
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>						1		1		
马赛菌属 <i>Massilia</i>								1		
<i>Lysinibacillus</i>						1				
代夫特菌属 <i>Delftia</i>						1				
总计 total	11	7	16	14	1	10	9	13	9	5

综合上述各表可以看出,野生和养殖银鲷消化道各部分菌群有较大差异。从消化道各部位可培养细菌的多样性看,野生银鲷幽门盲囊中细菌多样性最好,其次为胃、中肠及后肠,前肠最少,仅 1 株可培养细菌;养殖银鲷也是幽门盲囊中细菌多样性最好,随后依次为中肠,前肠,胃和后肠。从可培养细菌的分布看,野生银鲷中嗜冷菌属 (*Psychrobacter*) 分布最广,分离的菌株也最多,仅前肠中未有检出;其次是 *Pseudochrobacterum* 属,仅胃中未检出;养殖银鲷中不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 分布最广,整个消化道均有分布,且不动杆菌属在幽门盲囊中分离的菌株最多,而假单胞菌属在消化道各部分中分离的菌株数量分布较均匀。野生银鲷和养殖银鲷消化道共有菌仅 *Psychrobacter piscatorii* strain VSD503 (W6/Z8) 一株,但存在部位不同,野生银鲷存在于胃部 (W6),养殖银鲷存在于中肠 (Z8)。

2.3 产酶菌株的分离

野生银鲷产酶菌株的分离 野生银鲷消化

道内有 16 株可产酶培养菌,其中 44% 产蛋白酶,56% 产淀粉酶,11% 产脂肪酶,56% 产纤维素酶(表 7~表 8)。其中胃中产酶菌共 6 株,产两种以上酶的菌有 2 株,以产淀粉酶和纤维素酶的菌为主,仅一株菌产蛋白酶即 *Psychrobacter fozii* strain NF23,且产酶量丰富;幽门盲囊内产酶菌共 8 株,产两种以上酶的菌有 4 株,以产淀粉酶的菌为主,产纤维素酶的菌次之,产蛋白酶菌较少,仅 2 株分别为 *Pseudochrobacterum asaccharolyticum* strain CCUG46016、*Psychrobacter fozii* strain NF23,且产蛋白酶量较其他 2 种消化酶多;前肠内产酶菌仅 1 株即 *Pseudochrobacterum asaccharolyticum* strain CCUG46016,该菌即产蛋白酶、淀粉酶、又产纤维素酶,且产蛋白酶和纤维素酶量较淀粉酶多;中肠内产酶菌共 6 株,其中 3 株菌产 2 种以上酶,以产蛋白酶为主,淀粉酶和纤维素酶次之,仅 *Bacillus anthracis* strain TMPTTA CASMB 4 产脂肪酶,且产蛋白酶量较其他消化酶多。后肠内产酶菌共 2 株,其中 *Psychrobacter celer* strain Pb18 产 4 种消化酶。

表 7 野生银鲳消化道内产酶菌株
Tab.7 Enzyme-producing bacteria in the digestive tract of wild silver pomfret

菌株 strains	存在部位 habitat	蛋白酶(R/r) protease(R/r)	淀粉酶(R/r) amylase(R/r)	脂肪酶(±) lipase(±)	纤维素酶(R/r) cellulase(R/r)
<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain ALK634	Y/Z	-	1.5/1.2	-	-
<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> strain CCUG 46016	Y/Q	13/3	3/2.5	-	2/1
<i>Psychrobacter piscatorii</i> strain VSD503	W/Y	-	2/1.5	-	2/1.7
<i>Psychrobacter celer</i> strain Pb18	H	7/2	3/2.5	+	3/2.5
<i>Psychrobacter cibarius</i> strain LMG 7085	Y	-	-	-	2.5/1.8
<i>Brochothrix thermosphacta</i> strain KSN1	Y/H	-	3/1.5	-	2/1
<i>Psychrobacter fozii</i> strain Spedv2	W/Y	-	2.5/1.5	-	-
<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain D7084	W	-	-	-	1/0.7
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain HWG-A17	W	-	-	-	1.2/1
<i>Psychrobacter cibarius</i> strain JG-220	Y/W	-	2/1.5	-	-
<i>Bacillus cereus</i> strain LH8	Z	4/1	-	-	2.5/2
<i>Psychrobacter fozii</i> strain NF23	W/Y	12/3.5	2/1.5	-	2/1
<i>Bacillus anthracis</i> strain TMPTTA CASMB 4	Z	6/1.5	3/2.5	+	-
<i>Bacillus cereus</i> strain HN-Beihezhu1	Z	10/1.5	3/2.5	-	3/2.5
<i>Bacillus cereus</i> strain BC-3	Z	6/1.5	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> strain OPP5 3-2	Z	5/2	-	-	-

注:W:胃;Y:幽门盲囊;Q:前肠;Z:中肠;H:后肠;R/r = 透明圈直径/菌圈直径(下同)

Notes: W; the stomach; Y; the pyloric caeca; Q; the foregut Z; the midgut; H; the hindgut; R/r = diameter of the transparent circle/diameter of the bacteria circle(Hereinafter)

表 8 养殖银鲳消化道内产酶菌株
Tab.8 Enzyme-producing bacteria in the digestive tract of formed silver pomfret

菌株 strains	存在部位 habitat	蛋白酶(R/r) protease(R/r)	淀粉酶(R/r) amylase(R/r)	脂肪酶(±) lipase(±)	纤维素酶(R/r) cellulase(R/r)
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain OAct422	Y	5/2	-	-	-
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain ALK054	Y/Z	9/4	-	-	-
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 3-6	Y/W/Z/Q	5/3	-	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain Pa4	Y	5/2	-	-	-
<i>Acinetobacter venetianus</i> strain IARI-CS-50	Q	7/3	4/1.5	-	-
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain PRRZ5	W/Y	4/2	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> strain PCSB6	Z/W	-	2/1	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 7N-3b	Q	3/1	-	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain AJ-G3	Q	6/3	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain VITGS	H	5/3.5	5/3	-	6/3
<i>Paenibacillus typhae</i> strain xj7	Y	5/3	-	-	-
<i>Massilia alkalitolerans</i> strain Ka47	Z	3/1	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> strain S-1	H/Z/Y/Q	3/1	5/1.5	-	-
<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain VITWW1	Q	3/1	5/1	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain 261ZY15	W	5/3	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> strain TCP2	Y	5/3	-	-	-
<i>Psychrobacter faecalis</i> strain UCL-NF 1590	Q	4/1	4.5/1.5	-	-
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> strain MP17_2B	Y	2.5/1	5/1	-	-
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain 7	H/Y	3/2	-	-	-
<i>Exiguobacterium indicum</i> strain 13(BR43)	Z	2.5/1	4/2	-	-
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain XJUHX-18	W	4/3	-	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain CCNWQLS12	Y	6/4	-	-	-

相对于野生银鲟,养殖银鲟消化道中可检测到22株分泌消化酶的细菌,主要以产蛋白酶和淀粉酶为主,其中70%产蛋白酶,21%产淀粉酶,仅*Bacillus thuringiensis* strain VITGS产纤维素酶,无一株菌产脂肪酶。其中胃内4株菌产消化酶,仅*Micrococcus luteus* strain PCSB6产淀粉酶,其他3株菌产蛋白酶,产酶量较平衡;幽门盲囊内产消化酶菌共11株,其中*Pseudomonas putida* strain S-1、*Acinetobacter beijerinckii* strain MP17_2B既产蛋白酶又产淀粉酶且产酶量丰富,其他菌株仅产蛋白酶,产酶量一般;前肠内产消化酶菌共7株,其中4株菌既产蛋白酶又产淀粉酶,且产酶量丰富。中肠内产消化酶菌共6株,除了*Pseudomonas putida* strain S-1以外*Exiguobacterium indicum* strain 13(BR43)也产蛋白酶和淀粉酶,且产酶量丰富;后肠内产酶菌共3株,其中*Bacillus thuringiensis* strain VITGS既产蛋白酶、淀粉酶又产纤维素酶,且产酶量较均衡。

对比养殖和野生种群,养殖银鲟消化道菌群主要以产蛋白酶、淀粉酶为主,其中*Bacillus thuringiensis* strain VITGS,既产淀粉酶又产蛋白酶和纤维素酶,但产酶量都相对较少。在养殖银鲟中无产脂肪酶的菌株。相对于养殖银鲟,野生银鲟消化道产酶菌种类比较齐全,其中产3种酶以上的菌有5株,产酶量比较丰富且在不同的消化道中分布比较均匀。野生银鲟产酶菌主要为芽孢杆菌和嗜冷菌;养殖银鲟菌株比较丰富,除了芽孢杆菌、嗜冷菌,还有假单胞菌、不动杆菌、微小杆菌、微球菌、葡萄球菌等,但产酶种类不均衡,产纤维素酶和脂肪酶的菌比较少。

3 讨论

3.1 银鲟消化道菌群结构的分析

在野生和养殖银鲟消化道菌群结构对比分析中,两者菌群结构存在明显差异,而且消化道各部位的菌群结构也存在差异。Hoiben等^[19]在对养殖型和野生型鲑的肠道菌群的研究中发现,由于不同的生存环境,两者的菌群结构也存在明显差异。野生和养殖银鲟消化道菌群结构的差异与饵料结构、水体环境等存在很大关系。野生银鲟世代生存于自然海域,对温度、盐度、pH以及各营养物质有其相对应的适合性;养殖银鲟的生存环境主要靠人为控制来满足生长,但并不一定符合最

适环境条件,饵料生物无法做到与自然海域中的相同。东海野生银鲟的主要饵料为箭虫、虾类、水母类、头足类、仔稚鱼和浮游动物等^[20];解剖银鲟的消化道,从其结构看,消化道长度达到体长的2倍以上,因此银鲟属广食的杂食性鱼类,饵料结构比较复杂。而养殖银鲟主要以人工配合饲料,饵料结构相对比较简单。这在很大程度上影响了消化道菌群结构的改变。李可俊等^[21]在对长江河口8种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究中发现,生活在不同水层的鱼类,其肠道菌群结构存在明显差异;生活在同水层但食性不同的鱼类,其肠道菌群结构也存在较大差异。可以推测鱼类的肠道菌群结构随饵料生物的组成会发生较大的变动。本研究首次将野生和养殖银鲟肠道菌群结构进行初步的对比分析,为后续银鲟的人工健康养殖构建积累了基础数据。

3.2 银鲟肠道菌群中的产酶菌分析

不同的鱼类,不同消化道部位,不同的菌群结构其消化酶种类及活性都存在很大不同^[22]。在以往的研究中大多只分析了鱼类整个肠道的菌群结构,并没有系统地分析消化道各部分菌群结构特征及其产酶菌的分离。本实验不仅分析了野生和养殖银鲟消化道各部分的菌群结构,还将其消化道各部分产酶菌进行了分离鉴定。在对消化道各部分产酶菌株的分离鉴定中,野生银鲟消化道菌群既产蛋白酶、淀粉酶,又产纤维素酶、脂肪酶。野生银鲟胃、幽门盲囊、前肠、中肠、后肠菌群皆能产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶,除此之外,在中肠和后肠也分离出了产脂肪酶菌株。换言之,野生银鲟的胃、幽门盲囊、前肠、中肠、后肠都可对蛋白质、淀粉、纤维素进行分解,而脂肪的分解主要集中在中肠和后肠。相对于野生银鲟,养殖银鲟消化道中可培养菌群的产酶比较单一,主要以蛋白酶和淀粉酶为主,且只在后肠分离出了产纤维素酶的菌株,在整个消化道内未分离出产脂肪酶菌株。这或许会在一定程度上影响养殖银鲟对脂肪的消化,并有可能是导致人工养殖银鲟生长较野生银鲟生长逊色的原因之一。

综上可知,虽然养殖银鲟消化道菌群结构较野生种复杂,但产酶菌株却相对比较单一。在产酶菌分离鉴定实验中发现,养殖种群消化道内主要以产蛋白酶和淀粉酶为主,产纤维素酶的菌株很少,并未分离出产脂肪酶菌株。野生银鲟消化

道内不仅有丰富的产蛋白酶和淀粉酶的菌株,还有产脂肪酶和纤维素酶的菌株。食物组成是影响消化道菌群的重要因素。菌群和食物在某种程度上是互相适应的结果。所以在银鲟饲料中适当添加一些产纤维素酶和产脂肪酶的菌株,以期优化养殖银鲟的消化道菌群结构来提高其饵料利用率,这还有待于日后进一步的研究实验。

近几年,养殖生产中所用的产酶菌株大多是陆生菌,其在鱼类消化道内不一定很好地发挥作用^[23]。本研究将野生银鲟和养殖银鲟的消化道菌群结构及产消化酶菌进行对比分析,若能将野生银鲟消化道内分离出的高效产酶菌作为饲料添加剂用于养殖银鲟的养殖,这样不仅有利于消化酶很好地发挥其活性,而且有利于产酶益生菌在养殖银鲟消化道内成功定植,从而改变养殖银鲟消化道菌群结构。产酶益生菌能否发挥其最大作用,除了鱼类本身外还与 pH、温度等有关,所以在后续的实验,还需对产酶菌所需的最适 pH、温度等进行验证。此外,产酶益生菌是否能在养殖银鲟肠道内成功定植也需进一步实验。

3.3 肠道菌群结构分析方法的选用

本实验采用基础培养实验法对野生和养殖银鲟肠道菌群结构进行了初步的对比分析,实验本身存在一定的局限性,鱼类肠道中不仅存在好氧菌、兼性厌氧菌、厌氧菌还存在严格厌氧菌、不可培养菌^[24],以上分离出来的菌均为实验条件下可培养菌,所以在银鲟肠道内仍然存在一部分现有实验中不能分离的菌。此外,实验条件的局限性也可能导致某些可培养菌不能正常生长,如 pH、温度、培养基等都有可能影响菌的正常生长。因此野生和养殖银鲟肠道菌群结构的对比分析还需进一步实验。目前研究肠道菌群结构分析,最为普遍的是 FISH(荧光原位杂交)、核酸探针、随机扩增多肽 DNA、多重 PCR、脉冲凝胶电泳、DGGE(浓度梯度变性凝胶电泳)、TGGE(温度梯度变性凝胶电泳)、16sDNA、高通量技术等分子生物学手段。其中,较为准确的是高通量测序技术即下一代测序技术,该技术一次可测几百万条 DNA 序列,同时可进行多个样本的测定。目前较为常见的高通量技术为 454 焦磷酸测序、Illumina (Solexa) sequencing 及 ABISOLiDsequencing^[25],同时,高通量技术也是研究菌群结构的发展趋势。除此之外,本实验只对可培养分离出的菌进行初

步的产酶能力的鉴定,产酶菌作为饲料添加剂用于养殖生产,还存在很多需要考虑的问题,比如投喂对象、投喂的最佳方法、投喂的最佳阶段、投喂所需的环境条件等。然而,从水生动物体内分离出有益菌作为饲料添加剂用于水产养殖,代替传统意义上的抗生素及化学药物,这将是未来健康养殖的重要途径。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Holmes E, Wilson I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431 - 438.
- [2] Li K, Tan Y G, Li W S, et al. Bifidobacterium to prevent intestinal flora imbalance after chemotherapy clinically [J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 31(1): 82 - 84. [李凯, 谭永刚, 李午生, 等. 双歧杆菌预防化疗后肠道菌群失调症的临床研究. *微生物学杂志*, 2011, 31(1): 82 - 84.]
- [3] Ray A, Ghosh K, Ring E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut; a review [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(5): 465 - 492.
- [4] Clements K D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes [M]. London: Chapman & Hall, 1997: 156 - 198.
- [5] He M, Wang K Y, Zhang Y, et al. Effects of compound microbiological preparation on growth, activities of digestive enzymes, intestinal microflora of *Schizothorax (Racoma) davidi* (Sauvage) and water quality parameters [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 5(20): 534 - 539. [何敏, 汪开毓, 张宇, 等. 复合微生物制剂对重口裂腹鱼生长、消化酶活性、肠道菌群及水质指标的影响. *动物营养学报*, 2008, 5(20): 534 - 539.]
- [6] Lai K Z, Lü Y H, Liang M Z, et al. Tilapia growth and intestinal protease activity analysis after compound probiotics addition in diet [J]. *Journal of Southern Agricultural*, 2012, 43(11): 1769 - 1774. [赖凯昭, 吕逸欢, 梁明振, 等. 饵料中添加益生菌对奥尼罗非鱼生长性能和肠道蛋白酶活性的影响. *南方农业学报*, 2012, 43(11): 1769 - 1774.]
- [7] Peng S M, Chen X Z, Shi Z H, et al. Survival of Juvenile Silver Pomfret, *Pampus argenteus*, Kept in Transport Conditions in Different Densities and Temperatures [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2012, 64(1): 678 - 683.
- [8] Yin F, Sun P, Peng S M, et al. Effects of low salinity

- stresses on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the ATPase activities in its gill and kidney [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4): 1059 - 1066. [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(4): 1059 - 1066.]
- [9] Shi Z H, Zhang C J, Peng S M, *et al.* Effects of salinity on serum osmolality, catalase and gill ion-regulatory enzyme activity in silver pomfret [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 11(37): 1697 - 1705. [施兆鸿, 张晨捷, 彭士明, 等. 盐度对银鲳血清渗透压、过氧化氢酶及鳃离子调节酶活力的影响. *水产学报*, 2013, 37(11): 1697 - 1705.]
- [10] Peng S M, Lin S Z, Shi Z H, *et al.* Effects of rearing density on growth rate and digestive enzyme activity of juvenile *Pampus argenteus* [J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(1): 72 - 76. [彭士明, 林少珍, 施兆鸿, 等. 饲养密度对银鲳幼鱼增重率及消化酶活性的影响. *海洋渔业*, 2013, 35(1): 72 - 76.]
- [11] Peng S M, Shi Z H, Sun P, *et al.* Effects of diet composition on growth rate, muscle amino acid and fatty acid composition of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*) [J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1): 51 - 56. [彭士明, 施兆鸿, 孙鹏, 等. 饲料组成对银鲳幼鱼生长率及肌肉氨基酸、脂肪酸组成的影响. *海洋渔业*, 2012, 34(1): 51 - 56.]
- [12] Sun Y H, Zhou K Y, Xiong Z. Screening and identification of protease-producing bacterium from intestinal canal of dendrolimu and liquid culture studies [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(14): 18 - 21. [孙佑赫, 周开艳, 熊智. 松毛虫肠道产蛋白酶菌株的筛选鉴定及培养条件研究. *中国农业学报*, 2012, 28(14): 18 - 21.]
- [13] Liu Z, Zhang Y G, Zhang W W, *et al.* Screening of amylase-producing bacteria and optimization of the condition for enzyme production [J]. *Feed Industry*, 2012, 33(23): 27 - 30. [刘震, 张永根, 张微微, 等. 淀粉分解菌的筛选及产酶条件的优化. *饲料工业*, 2012, 33(23): 27 - 30.]
- [14] Zhang S M. The isolation of amylase-producing bacterial strains and determination amylase-producing condition [J]. *Soil and Fertilizers*, 2006, 3(2): 253 - 259. [张双民. 土壤中淀粉酶高产菌株的分离及产酶条件的优化. *土壤肥料*, 2006, 3(2): 253 - 259.]
- [15] Wang J Z, Yuan J G, Yang D, *et al.* Screening of lipase producing strains and its breeding by UV-photoreactivation mutagenesis [J]. *Food and Drug*, 2011, 13(5): 192 - 195. [王金主, 袁建国, 杨丹, 等. 产脂肪酶菌株的筛选及紫外 - 光复活诱变. *食品与药品*, 2011, 13(5): 192 - 195.]
- [16] Li J, Lan G H, Zang F W, *et al.* Separation, identification and cloing of *lipA* from lipase-prducing microorganism [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(17): 138 - 142. [李璟, 兰贵红, 张飞伟, 等. 产脂肪酶微生物的筛选鉴定及脂肪酶 *lipA* 基因克隆. *广东农业科学*, 2012, 39(17): 138 - 142.]
- [17] Zhao W, Wang L Q, Zheng J, *et al.* Isolation, identification of lipase production strain and optimization of the fermentation condition [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2010, 33(3): 88 - 92. [赵伟, 王俐琼, 郑甲, 等. 产脂肪酶菌株的分离、鉴定及其产酶条件优化. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, 33(3): 88 - 92.]
- [18] Hu G H, Su X P, Pan H, *et al.* Study of screening of cellulase-producing strain and its fermentation productions [J]. *Journal of China Three Gorges University: Natural Sciences*, 2013, 35(4): 99 - 102. [胡格华, 苏香萍, 潘虹, 等. 纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件的研究. *三峡大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(4): 99 - 102.]
- [19] Hoiben W E, Williams P, Saarinen M, *et al.* Phylogenetic analysis of intestinal microflom indicates a novel *Mycoplasma pbylotype* in farmed and wild salmon [J]. *Microbial Ecology*, 2002, 44(2): 175 - 185.
- [20] Peng S M, Shi Z H, Yin F, *et al.* Feeding habits of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in East China Sea based on stable isotope techniques [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(7): 1565 - 1569. [彭士明, 施兆鸿, 尹飞, 等. 利用碳氮稳定同位素技术分析东海银鲳食性. *生态学杂志*, 2011, 30(7): 1565 - 1569.]
- [21] Li K J, Guan W B, Xu J L, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial diversity of the intestinal system in eight kinds of wild fishes from the Changjiang river estuary [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2007, 19(3): 267 - 269. [李可俊, 管卫兵, 徐晋麟, 等. PCR-DGGE 对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究. *微生物学杂志*, 2007, 19(3): 267 - 269.]
- [22] Bitterlich G. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp,

- Aristichthys nobilis* Rich [J]. Journal of Fish Biology, 1985, 27(2): 103 - 112.
- [23] Lei Z Y, He L, Wang Z Y, *et al.* Study on Isolation of Cellulase-Production Strains from the Digestive Tract of Grass Carp and the Conditions for Cellulase Production [J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 27(4): 54 - 57. [蕾正玉, 何力, 王朝元, 等. 草鱼体内产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的研究. 微生物学杂志, 2007, 27(4): 54 - 57.]
- [24] Asfie M, Yoshijima T, Sugita H. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent *in situ* hybridization method [J]. Fisheries Science, 2003, 69(1): 21 - 26.
- [25] Teng X K, Xiao H S. Analysis of prospects on microarray and high-throughput DNA sequencing technology [J]. Science in China (Series C: Life Sciences), 2008, 38(10): 891 - 899. [腾晓坤, 肖华胜. 基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2008, 38(10): 891 - 899.]

Comparative analysis of enzyme-producing bacteria in the digestive tract flora of wild and breeding silver pomfret

WANG Jianjian^{1,2}, GAO Quanxin¹, ZHANG Chenjie¹, PENG Shiming¹,
WANG Jiangang¹, SHI Zhaohong^{1,2*}

(1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, we qualitatively compared and analysed microbial community structure in stomach, pylorus, foregut, midgut, hindgut of wild and farmed silver pomfret (*Pampus argenteus*), isolated and identified produced protease, amylase, lipase, cellulase strains. The results showed very different structure of flora between each part of the digestive tract, and microflora populations of the entire digestive tract of the wild and farmed silver pomfret were quite different. The digestive tract flora of the wild silver pomfret mainly included *Psychrobacter* species, *Bacillus* species, and the digestive tract flora of the farmed silver pomfret mainly included *Acinetobacter* species, *Pseudomonas* species, *Psychrobacter* species. *Psychrobacter piscatorii* strain VSD503 was the only kind of bacteria, which not only existed in the digestive tract of the wild silver pomfret but also existed in the digestive tract of the breeding silver pomfret, but there are different parts. In the experiments of identification of enzyme-producing bacteria, culturable bacteria in the digestive tract of wild silver pomfret yielded protease by 44%, amylase by 56%, lipase by 11%, cellulase by 56%, of which more than three enzymes strains had 5 kinds, and rich enzyme production. Relative to the wild silver pomfret, culturable bacteria in the digestive trace of breeding silver pomfret mainly produced protease and amylase, producing protease by 70%, producing amylase by 21%, and only *Bacillus thuringiensis* strain VITGS producing cellulose, no bacteria could produce lipase, and only *Bacillus thuringiensis* strain VITGS can yield three kind of enzymes, but relatively few amount of enzyme production. Analysis shows that the structure of the digestive tract flora affected the species and the activity of digestive enzymes, so enzyme-producing bacteria in the digestive tract of wild silver pomfret can be used as feed additives for the aquaculture of silver pomfret, which can increase production of silver pomfret.

Key words: *Pampus argenteus*; the structure of the digestive tract flora; enzyme-producing bacteria; digestive enzymes

Corresponding author: SHI Zhaohong. E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn