

文章编号: 1000-0615(2016)09-1416-15

DOI: 10.11964/jfc.20160210289

育肥饲料中虾青素含量对雄性中华绒螯蟹肠道和鳃部可培养优势细菌数量和组成的影响

马文元¹, 吴旭干^{1,2}, 张小明¹, 赵庆², 刘灿²,
龙晓文³, 成永旭^{2,3}, 张庆华^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 在育肥饲料中添加虾青素会影响中华绒螯蟹肠道及鳃内的可培养优势菌群以及机体的免疫力, 本实验旨在探讨饲料中虾青素含量及养殖水体对其肠道和鳃部菌群的影响。采用不同虾青素含量的饲料(0.00、26.60、41.62、81.37和75.35 mg/kg, 分别对应饲料1#~5#)对雄性中华绒螯蟹进行育肥70 d后, 利用基础培养基和选择性培养基对其肠道、鳃及养殖水体中的细菌进行传统分离和纯化, 所得菌株进行16S rRNA测序, 再进行同源性分析后做系统进化树。结果发现, 在分离获得的106株细菌(登录号: KU570293~KU570368, KU570370, KU570372~KU570383, KU601302~KU601316, KU720553)中, 92株为优势菌株, 其中, 肠道、鳃部和水体各29、32和31株。肠道中的可培养优势细菌属于柠檬酸杆菌属、假单胞菌属和气单胞菌属; 而鳃中可培养优势细菌属于柠檬酸杆菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属和气单胞菌属; 养殖水体中可培养优势细菌属于芽孢杆菌属、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、假单胞菌属和黄杆菌属。饲料2#组肠道中可培养细菌总数最高(1.06×10^8 cfu/g); 饲料5#肠道中的潜在致病菌数量最低, 但其可培养细菌总数显著高于其他饲料组; 饲料3#组肠道和鳃中潜在致病菌数量相对较高。研究表明, 饲料中添加不同含量的虾青素能够显著影响雄性中华绒螯蟹肠道和鳃中的菌群构成, 但对水体中可培养细菌数量无显著影响。本研究首次对投喂不同含量虾青素饲料的育肥期雄性中华绒螯蟹肠道、鳃及养殖水体可培养的优势细菌数量和组成进行分析, 探究了饲料中虾青素含量以及养殖水体与蟹肠道内可培养细菌之间的联系, 为中华绒螯蟹营养免疫和菌群调控提供了理论基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 虾青素; 肠道; 鳃; 养殖水体; 优势细菌

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

虾青素(astaxanthin)又名变胞藻黄素、虾红素、虾黄质、龙虾壳色素, 是类胡萝卜素的一种, 属于一种脂溶性的色素, 在虾、蟹、鲑以及藻类等海洋生物中常见。目前已知天然虾青素以雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)中的含量最

高, 为100%左旋反式(3S-3'S)结构, 生物学活性最强^[1]。研究表明, 虾青素能够促进水产养殖动物的生长^[2]、着色^[3]及免疫性能^[2, 4]的提高, 并增强养殖产品的营养价值和商品价值^[5]。目前, 虾青素已作为饲料添加剂普遍应用于水产行业。

收稿日期: 2016-02-21 修回日期: 2016-04-29

资助项目: 上海市科委部分地方能力院校建设项目(13320502100); 科技部中小企业创新基金(14C26213201214); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206); 上海市科委项目(16DZ2281200)

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹、大闸蟹,营养价值高、风味独特,是我国名贵的水产品之一^[6]。近年来,由于大规模、高密度的养殖,加之养殖环境的恶化,引起中华绒螯蟹种质退化,细菌、真菌和病毒等疾病频繁发生,给中华绒螯蟹养殖业带来极大损失^[7]。越来越多的学者开始强调健康养殖的理念,生态养殖和免疫增强剂已经成为降低中华绒螯蟹病害风险的重要手段,饲料添加剂逐渐成为了当前研究的热点之一^[11, 8]。

近年来,在追求健康理念的倡导下,有关肠道菌群的研究成为学者关注的焦点。肠道是一个复杂的微生态系统,具有消化吸收营养和防御疾病的双重功能,肠道内存在的多种多样的微生物,共同组成一个处于动态平衡的微生态系统^[10]。已有研究表明,肠道细菌是影响水生动物健康的重要因素之一^[10-12]。肠道菌群和机体免疫之间存在着必然联系,通过营养调控或药物调控使动物肠道免疫功能维持在最佳水平是降低动物疾病的重要手段^[13]。研究表明,果胶、麦麸(木糖源)的使用能够显著影响中华绒螯蟹肠道的菌群结构^[14],饲料成分对个体的消化吸收、生长发育及抗病力等意义重大^[15],饲料中虾青素水平对虾类抗病和免疫性能影响显著^[16-17],这些研究结果提示,饲料中添加虾青素有可能改善了中华绒螯蟹的肠道菌群结构,从而提高其免疫性能。

回顾以往对中华绒螯蟹的研究,大多集中于对其生长、繁殖和免疫力等方面,而关于中华绒螯蟹肠道菌群的报道较少。2007年Li等^[18]报道了池塘高密度养殖和野生条件下的中华绒螯蟹肠道优势菌为变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),且池塘高密度养殖的中华绒螯蟹个体差异性大。2015年,Chen等^[19]对太湖养殖的雌性中华绒螯蟹肠道菌群的分析表明其优势菌为拟杆菌门、柔膜菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门。这些工作为进一步了解中华绒螯蟹的肠道菌群提供了重要资料,但同时也具有一定的局限性。在特定的养殖季节,饲料以及水环境对养殖动物肠道菌群的影响尤为重要,而水环境中的正常菌群通过口腔和鳃进入体内,是“过路”还是“定殖”将直接影响肠道的菌群结构。本实验主要针对虾青素及养殖水体对中华绒螯蟹肠道和鳃中可培养的优势菌群

结构的影响,将饲料添加剂的使用与机体菌群结构的平衡联系起来,通过对肠道和鳃部菌群的结构分析,评价虾青素对中华绒螯蟹抗病能力的影响,而目前类似的研究还鲜有报道;此外,本实验同时使用了传统的细菌分离和16S rRNA序列鉴定方法,二者互补,提高了研究的完整性,为虾青素在中华绒螯蟹养殖中的合理使用以及相关作用机制研究提供了理论依据,为今后微生态制剂的开发提供了宝贵的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 饲料及养殖条件

实验饲料共分为5组,以鱼粉、豆粕、棉籽粕和谷朊粉等为主要蛋白源,鱼油、豆油和菜籽油为脂肪源配制基础饲料,第1、2、3、4组在基础饲料中分别添加不同含量的雨生红球藻粉(云南爱尔发生物技术有限公司),第5组在基础饲料中添加藻渣,其中各组虾青素含量分别为0.00、26.60、41.62、81.37和75.35 mg/kg(表1)。实验于2015年9月6日至11月14日在上海海洋大学崇明基地室外土池(长×宽×深=7.8 m×7.8 m×0.7 m)进行,每个实验池塘中放入25只雄蟹,每个饲料组分为3个重复池塘,每天18:00左右投喂1次。

1.2 中华绒螯蟹样品的采集及细菌培养

2015年11月14日,在养殖基地采集5组不同虾青素含量饲料投喂的雄性中华绒螯蟹的肠道(intestine,I)和鳃(gill,G)组织,每组各取4只进行实验。实验蟹生物学特征见表1。

参照Olsson等^[20]的方法稍作修改。用75%的酒精擦拭活蟹体表进行消毒,无菌条件下活体解剖,取出其完整肠道和部分鳃组织。将取出包含内容物的完整肠道和鳃组织按1:10(质量:体积)加0.65%生理盐水,用灭菌的玻璃匀浆器进行研磨,研磨好的组织匀浆液10倍梯度稀释至 10^{-11} ;养殖水体的采样时间为2015年10月6日,每个池塘采集养殖水体和少量底泥混合物(标记W)500 mL,10倍梯度稀释至 10^{-3} 。按照样品来源及性质不同,分别在营养琼脂、硫柠檬蔗糖琼脂、RS琼脂、麦康凯以及沙门菌-志贺菌琼脂培养基上进行计数(表2),每个直径约9 cm的平板涂布0.2 mL待检液,用无菌涂布棒涂抹至平板表面无明显液体;每个稀释度做3个平行,37 °C培

表1 实验饲料和中华绒螯蟹生物学特性
Tab.1 Experiment fodder and biological characteristics of *E. sinensis*

组别 group	饲料中虾青素含量/(mg/kg) concentration of astaxanthin in the dietary	体质量/g weight	壳长/mm length	壳宽/mm wide
1#	0.00	117.27±9.46	55.72±0.83	58.46±1.26
2#	26.60	126.89±6.86	58.89±1.01	65.24±1.29
3#	41.62	132.42±1.17	59.18±0.50	65.86±0.61
4#	81.37	129.67±3.26	58.40±0.13	65.64±0.86
5#	75.35	134.45±2.53	60.19±0.25	65.92±0.44

表2 培养基及用途

Tab.2 Media used in this paper and their functions

培养基 medium	用途 usage
营养琼脂 nutrient agar(NA)	细菌总数计数
硫柠檬蔗糖琼脂 thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium(TCBS)	弧菌选择性培养与计数
RS琼脂 Rimler-Shotts agar(RS)	气单胞菌选择性培养与计数
麦康凯 MacConkey Agar(MAC)	肠道致病菌选择性培养与计数
沙门菌—志贺菌琼脂 salmonella-shigella agar (SS)	养殖水及底泥混合物中肠道杆菌的分离培养与计数

注：以上培养基均购自北京陆桥医学学生物技术有限公司

Note: All media were purchased from Beijing Land Bridge Technology CO. LTD

养18~24 h, 选择菌落数在30~300有效计数范围内的平板, 分别进行计数。平板上菌落形态特征相同的菌株数占整个平板数量10%以上的菌株作为优势菌, 挑取各培养基上的优势菌落进行纯培养。

1.3 菌株的分离纯化、16S rRNA序列鉴定和系统发育树构建

挑取不同菌落形态的单菌落在营养琼脂培养基上进行纯培养, 取1.5 mL菌液送到上海杰李生物技术有限公司进行测序, 采用16S rRNA通用引物: (27F: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGC TCAG-3'; 1492R: 5'- CGGTTACCTTGTT ACGACTT-3')。PCR反应体系: 2×Taq Master Mix (Vazyme) 20 μL, 10 μmol/L引物各0.8 μL, 模板1.5 μL, ddH₂O补充至40 μL。PCR扩增程序为94 °C变性3 min, 然后进入35个循环: 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min。最后72 °C延伸10 min。测序结果于NCBI上进行BLAST比对, 确定菌株的种类。菌株测序结果在NCBI中的BLAST程序进行同源性检索, 与GenBank中已知的基因

片段进行比较, 利用Sequin软件编辑序列上传至NCBI获取序列号(accession number), 通过Mega 5.1软件构建系统发育树。

1.4 肠道、鳃部和养殖水体可培养的优势细菌组成在属水平上的比较

将肠道、鳃部和水体中可培养的优势细菌种类在属水平上进行两两比较, 以圈图示意相同与不同之处。对比不同部位分离的优势细菌的差异。

1.5 数据分析

数据经SPSS 19.0软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 结果以(mean±SE)表示, 若存在显著差异, 用Duncan氏法进行多重比较, 当 $P<0.05$ 时认为差异显著, 经GraphPad Prism 5软件制图。

2 结果

2.1 投喂不同虾青素含量的饲料对中华绒螯蟹肠道可培养细菌数量的影响

在NA培养基上, 从第1#组至第5#组不同虾青素含量饲料投喂的雄性中华绒螯蟹肠道内可培养细菌总数分别为 4.06×10^7 、 1.06×10^8 、 2.01×10^7 、 4.35×10^7 和 3.42×10^7 cfu/g, 第2#组可培养细菌数量明显高于其他各组($P<0.05$)(图1-a); 在MAC培养基上, 获得的肠道菌群数量从第1#组至第5#组分别为 1.84×10^9 、 3.70×10^8 、 2.15×10^7 、 3.10×10^8 和 9.06×10^8 cfu/g, 第1#组可培养细菌数量高于其他4组, 且与数量最低的第3#组存在显著差异($P<0.05$)(图1-b); 在TCBS培养基上, 获得的弧菌数量从第1#组至第5#组分别为 7.75×10^6 、 1.07×10^6 、 1.42×10^6 、 1.46×10^6 和 1.67×10^5 cfu/g, 第1#组可培养细菌数量高于其他4组, 且与数量最低的第5#组存在显著差异($P<0.05$)(图1-c); 在RS培养基上, 5组均未有菌落生长。

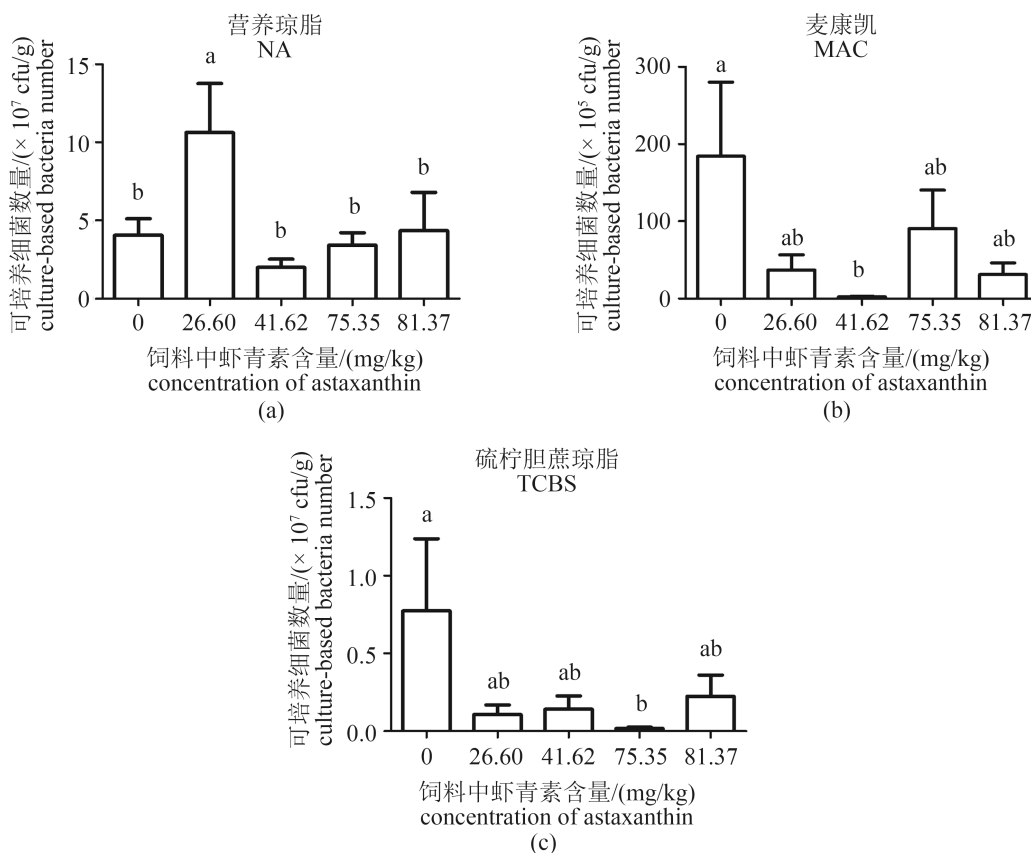


图1 肠道中不同培养基上可培养细菌数量($n=4$)

a或b表示差异显著($P<0.05$), ab表示差异不显著($P>0.05$), 下同

Fig. 1 The number of culturable bacteria in different media from the intestine

a or b means significant difference ($P<0.05$), ab means no significant difference ($P>0.05$), the same below

2.2 投喂不同虾青素含量的饲料对中华绒螯蟹鳃部可培养细菌数量的影响

在NA培养基上, 从1#组至5#组不同虾青素含量饲料投喂的雄性中华绒螯蟹鳃部可培养细菌总数分别为 3.32×10^7 、 1.59×10^7 、 3.17×10^8 、 2.79×10^9 和 2.98×10^8 cfu/g, 第5#组可培养细菌数量显著高于第1#组, 也显著高于第2#组($P<0.05$), 这3组与其他2组间无显著性差异(图2-a); 在RS培养基上, 获得的气单胞菌从第1#组至第5#组分别为 2.74×10^{10} 、 2.14×10^{11} 、 4.24×10^{11} 、 1.40×10^{11} 和 1.51×10^{11} cfu/g, 各组可培养细菌数量均没有显著性差异(图2-b); 在TCBS培养基上, 获得的弧菌从第1#组至第5#组分别为 1.00×10^8 、 3.12×10^8 、 9.24×10^8 、 1.30×10^8 和 5.48×10^7 cfu/g, 各组可培养细菌数量均没有显著性差异(图2-c)。

2.3 养殖水体中可培养细菌的数量

在NA培养基上, 从第1#组至第5#组不同虾

青素含量饲料投喂的中华绒螯蟹养殖水体中可培养细菌总数, 分别为 1.60×10^3 、 1.85×10^3 、 8.44×10^3 、 3.25×10^3 和 7.28×10^3 cfu/mL(图3-a); 在TCBS培养基上, 获得的弧菌从第1#组至第5#组分别为 6.85×10^2 、0、 5.63×10^2 、 7.83×10^2 和 1.19×10^3 cfu/mL(图3-b); 在RS培养基上, 获得的气单胞菌从第1#组至第5#组分别为 1.78×10^2 、 1.80×10^2 、 1.98×10^3 、 1.38×10^3 和 8.37×10^2 cfu/mL(图3-c); 在SS培养基上, 从第1#组至第5#组分别为 3.28×10^2 、 3.57×10^2 、 1.58×10^3 、 3.57×10^3 和 6.76×10^2 cfu/mL(图3-d)。在这4种培养基上, 5组可培养细菌数量均没有显著性差异。

2.3 投喂不同虾青素含量的饲料对中华绒螯蟹肠道可培养的优势细菌组成的影响

从肠道分离得到优势菌株29株, 共计6种不同的优势菌种, 分别是弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)、嗜水

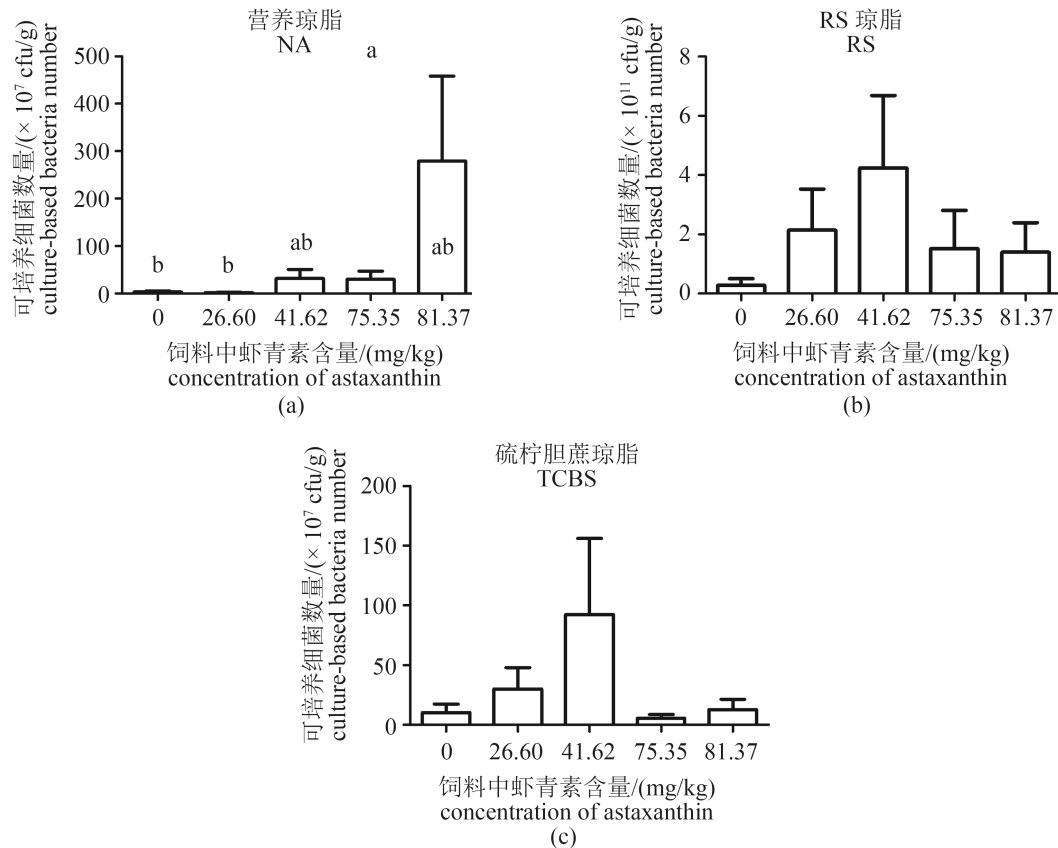


图2 鳃部不同培养基上可培养细菌数量($n=4$)

Fig. 2 The number of culturable bacteria in different media from the gills

气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和摩氏摩根菌(*Morganella morganii*), 分别属于柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)和摩根菌属(*Morganella*), 其中潜在致病菌为嗜水气单胞菌和摩氏摩根菌(表3)。

2.4 投喂不同虾青素含量的饲料对中华绒螯蟹鳃部可培养细菌组成的影响

从鳃部分离得到优势菌株32株, 共计8种不同的优势菌种, 分别是弗氏柠檬酸杆菌、蜡状芽孢杆菌、产氮芽孢杆菌(*Bacillus azotoformans*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)、日本假单胞菌(*P. japonica*)、*P. alkylphenolia*、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*), 分别属于柠檬酸杆菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属和气单胞菌属, 其中潜在致病菌为嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌(表4)。

2.5 养殖水体可培养的优势细菌的组成

养殖水体中共分离得到优势菌株31株, 共计11种不同的优势菌种, 分别是短小芽孢杆菌

(*B. pumilus*)、海水芽孢杆菌(*B. aquimaris*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、嗜硼芽孢杆菌(*B. boroniphilus*)、食物芽孢杆菌(*B. cibi*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、嗜虫假单胞菌(*P. entomophila*)和粘金黄杆菌(*Chryseobacterium gleum*), 分别属于芽孢杆菌、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、假单胞菌属和黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 潜在致病菌为嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌(表5)。

2.6 肠道、鳃部和养殖水体可培养优势细菌的系统进化树

将测序得到的肠道、鳃部和养殖水体可培养优势细菌16S rRNA序列作系统进化树(图4), 显示所得到的可培养优势菌株的分类地位。由进化树中可以看出在种水平上, 肠道、鳃部和养殖水体中共有的优势菌为弗氏柠檬酸杆菌和嗜水气单胞菌; 肠道和鳃部共有的优势菌为杀鲑气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌和嗜水气单胞菌; 鳃部和养殖水体中共有的优势菌为蜡状芽孢杆

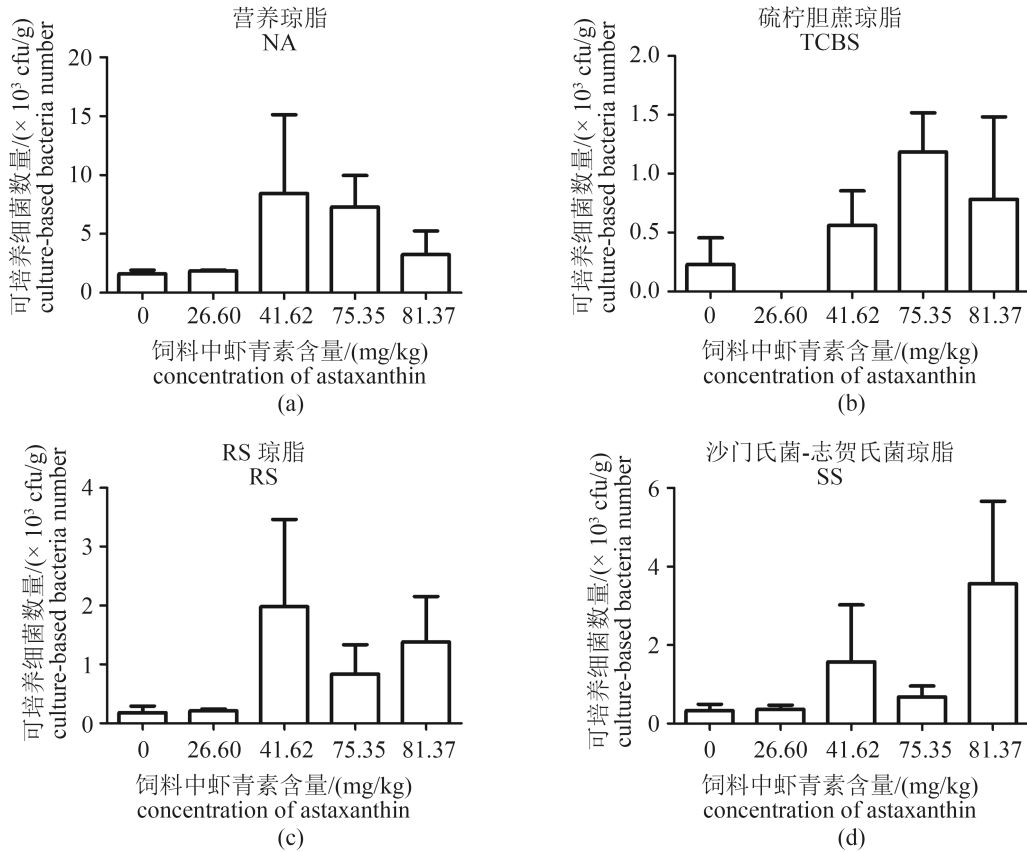


图3 养殖水体中不同培养基上细菌数量(n=3)

Fig. 3 The number of culturable bacteria in different media from the aquaculture water

菌、弗氏柠檬酸杆菌和嗜水气单胞菌; 肠道和水体中共有的优势菌为弗氏柠檬酸杆菌和嗜水气单胞菌。

2.7 属水平上肠道、鳃部和养殖水体可培养优势细菌组成的比较

将肠道、鳃部和养殖水体中可培养的优势细菌种类在属水平上进行两两比较, 发现肠道和水体的共有菌属是气单胞菌属和柠檬酸杆菌属; 肠道和鳃部的共有菌属为气单胞菌属、假单胞菌属和柠檬酸杆菌属; 而鳃部和水体的共有菌属为气单胞菌属、柠檬酸杆菌属和芽孢杆菌属; 肠道、鳃部以及养殖水体这三者的共有菌属为气单胞菌属和柠檬酸杆菌属(图5)。

3 讨论

本实验首次用传统的细菌培养方法, 从育肥期的雄性中华绒螯蟹的肠道、鳃部和水体中共分离到106株细菌, 其中优势细菌 92株, 包括肠道29株、鳃部32株、养殖水体31株。评价了不

同虾青素含量的饲料对其肠道优势菌群的影响, 同时比较了肠道菌群与鳃部及水体环境中存在的菌群的相似性, 分析了饲料中虾青素和水体环境对肠道菌群的影响, 为虾青素和微生物生态制剂在中华绒螯蟹养殖中的合理使用以及相关作用机制研究奠定了基础。较以往只对野生和养殖的中华绒螯蟹肠道菌群的对比研究^[18-19], 充分考虑了人工配合饲料和环境因素对中华绒螯蟹体内菌群数量和组成的影响, 更加深入和具体。

肠道微生物与宿主的相互关系对水产动物健康养殖至关重要^[21-22]。饲料是众多影响水产动物肠道菌群因素中的关键因素, 不同种类的饲料, 甚至饲料中的不同水平的营养素组成, 都对肠道中正常菌群产生影响。Ringø等^[23]的研究表明, 当将投喂幼苗的饵料由活性饵料改为配合饲料时, 其肠道内的细菌数量会发生大幅度的下降, 但原来的优势菌群仍占据着主要的比例。本实验中, 随着饲料中虾青素含量的提高, 中华绒螯蟹肠道可培养细菌总数有呈现先升高后下降的趋势, 其中, 当虾青素含量为26.60 mg/kg时,

表 3 雄性中华绒螯蟹肠道(I)优势菌株16S rRNA基因序列分析

Tab. 3 Sequence analysis of 16S rRNA of gene for dominant bacteria of intestine from male *E. sinensis*

组别 group	编号 number	分离株编号 isolate number	参考菌株登录号 GenBank accession number	鉴定结果 identification result	相似度/% identity	序列号 accession number	门 phylum	优势属 genus	优势种 species
I-1	I-1-1	I-M-1-2	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌	99	KU570293	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
		I-N-1-1-1			99	KU570311			
		I-N-1-3			99	KU570298			
		I-T-1-2			99	KU570302			
		I-T-1-3			99	KU570303			
	I-1-2	I-M-1-1-1	NC_002516.1	绿脓杆菌	100	KU570306	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	
		I-M-1-1-2			100	KU570307			
	I-1-3	I-N-1-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌	99	KU570297	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
		I-T-1-1			99	KU570301			
	I-2	I-2-1	I-M-2-2-3	NC_002516.1	绿脓杆菌	100	KU570310	变形菌门 Proteobacteria	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>
I-N-2-2-1					100	KU570312			
I-2-2		I-M-2-2-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌	99	KU570308	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	
		I-M-2-2-2			99	KU570309			
		I-M-2-1			99	KU570314			
I-2-3		I-M-2-2	NC_008570.1	嗜水气单胞菌	98	KU570315	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
		I-N-2-1			98	KU570318			
		I-T-2-1			99	KU570321			
I-2-4		I-N-2-3	NC_002516.2	产碱假单胞菌	100	KU570319	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	产碱假单胞菌 <i>P. alcaligenes</i>	
I-3		I-3-1	I-N-3-2-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌	99	KU570313	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>
	I-T-3-3				99	KU570324			
	I-3-2	I-T-3-2	NC_008570.1	嗜水气单胞菌	99	KU570323	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
	I-3-3	I-M-3-1	NC_009348.1	杀鲑气单胞菌	99	KU570316	嗜水气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	
		I-N-3-1			98	KU570320			
I-4	I-4-1	I-T-5-2	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌	99	KU570305	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
		I-T-4-1			99	KU570304			
	I-4-3	I-N-4-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌	99	KU570322	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
I-5	I-5-1	I-M-5-3	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌	99	KU570296	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
		I-N-5-2			99	KU570300			
	I-5-2	I-N-5-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌	99	KU570299	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
	I-5-4	I-N-5-1-2	NC_002516.1	绿脓杆菌	99	KU570318	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	

肠道可培养细菌总数为 1.06×10^8 cfu/g, 达到最高, 而当虾青素含量为41.62 mg/kg时降低到最低值 2.01×10^7 cfu/g, 并且, 由于本实验所用中华绒螯

蟹来自同一饲料组不同的养殖池塘, 个体间菌群结构和数量的差异较大。Chaiyapechara等^[11]对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究中也发现, 在

表 4 雄性中华绒螯蟹鳃部(G)优势菌株16S rRNA基因序列分析

Tab. 4 Sequence analysis of 16S rRNA of gene for dominant bacteria of gills from male *E. sinensis*

组别 group	编号 number	分离株编号 isolate number	参考菌株登录号 GenBank accession number	鉴定结果 identification result	相似度/% identity	序列号 accession number	门 phylum	优势属 genus	优势种 species							
G-1	G-1-1	G-N-1-3-3	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	99	KU570325	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>							
		G-R-1-3-1														
		G-T-1-3-1														
		G-N-1-2														
		G-R-1														
		G-T-1														
		G-T-1-3														
	G-T-1-4															
	G-1-2	G-T-1-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	99	KU570348		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>							
		G-T-1-2														
	G-1-3	G-R-1-1	NZ_CP009048.1	<i>P. alkylphenolia</i>	99	KU570339		假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	<i>P. alkylphenolia</i>							
	G-1-4	G-R-1-2	NC_009348.1	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	99	KU570340		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>							
										G-1-5	G-N-1-1	NC_002947.3	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	99	KU570335	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>
	G-2	G-2-1	G-R-2-1-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	99	KU570328	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>						
G-N-2-1																
G-R-2-2																
G-R-2-4																
G-N-2																
G-R-2																
G-3	G-3-1	G-R-3-1-1	NZ_JJRY01000021.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	99	KU570329	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>							
		G-3-2								G-T-3-1	产氮芽孢杆菌 <i>B. azotoformans</i>	92	KU570353	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	产氮芽孢杆菌 <i>B. azotoformans</i>
		G-3-3								G-N-3-1-2						
G-4	G-4-1	G-N-4-1-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	99	KU570326	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>							
		G-R-4-1-1														
		G-R-4-1-2														
		G-4-2								G-R-4-1	NC_002947.3	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	100	KU570344	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
G-4-3	G-R-4-3	NC_009348.1	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	99	KU570345	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>									
G-4-4	G-R-4-4	NZ_CP009048.1	<i>P. alkylphenolia</i>	99	KU570346	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	<i>P. alkylphenolia</i>									
G-5	G-5-1	G-N-5-2-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	99	KU570327	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>							
		G-R-5-2-2														
	G-5-2	G-N-5-1								NC_002947.3	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	99	KU570337	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	
	G-5-3	G-R-5-4								NZ_BBIR01000146.1	日本假单胞菌 <i>P. japonica</i>	99	KU570347		日本假单胞菌 <i>P. japonica</i>	

表5 养殖水体(W)优势菌株16S rRNA基因序列分析

Tab. 5 Sequence analysis of 16S rRNA of gene for dominant bacteria from aquaculture water

组别 group	编号 number	分离株编号 isolate number	参考菌株登录号 GenBank accession number	鉴定结果 identification result	相似度/% identity	序列号 accession number	门 phylum	优势属 genus	优势种 species
W-1	W-1-1	W-N-1-2-1	NC_004722.1	蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>	99	KU570358	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>
	W-1-2	W-N-1-2-2	NZ_BAUW01000204.1	嗜硼芽孢杆菌 <i>B.boroniphilus</i>	96	KU601302			嗜硼芽孢杆菌 <i>B.boroniphilus</i>
	W-1-3	W-N-1-2-3	NZ_JNVC02000019.1	食物芽孢杆菌 <i>B.cibi</i>	99	KU601303			食物芽孢杆菌 <i>B.cibi</i>
	W-1-4	W-S-1-1-2	NC_008027.1	嗜虫假单胞菌 <i>P.entomophila</i>	99	KU570373	变形菌门 Proteobacteria	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	嗜虫假单胞菌 <i>P.entomophila</i>
W-2	W-2-1	W-N-2-1-1	NC_014103.1	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>	100	KU601304	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>
	W-2-2	W-N-2-1-3	NC_004722.1	蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>	99	KU601306			蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>
		W-N-2-2-2			99	KU601308			
		W-N-2-3-2			99	KU570359			
	W-2-3	W-N-2-2-4	NZ_JNVC02000019.1	食物芽孢杆菌 <i>B.cibi</i>	99	KU601309			食物芽孢杆菌 <i>B.cibi</i>
	W-2-4	W-N-2-3-1	NZ_BAUW01000204.1	嗜硼芽孢菌属 <i>B.boroniphilus</i>	96	KU601310			嗜硼芽孢菌属 <i>B.boroniphilus</i>
	W-2-5	W-S-2-2-2	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>	99	KU570374	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>
	W-2-6	W-N-2-2-1	NC_009348.1	杀鲑气单胞菌 <i>A.salmonicida</i>	99	KU601307		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A.salmonicida</i>
W-3	W-3-1	W-N-3-1-1	NC_014103.1	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>	99	KU601311	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>
	W-3-2	W-N-3-1-2	NC_009848.1	短小芽孢杆菌 <i>B.pumilus</i>	99	KU601312			短小芽孢杆菌 <i>B.pumilus</i>
	W-3-3	W-N-3-1-4	NZ_CCMN01000022.1	海水芽孢杆菌 <i>B.aquimaris</i>	98	KU601314			海水芽孢杆菌 <i>B.aquimaris</i>
	W-3-4	W-N-3-3-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>	99	KU601315	变形菌门 Proteobacteria	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>
		W-R-3-1-1			99	KU570380			
		W-S-3-1-1			99	KU570375			
	W-3-5	W-N-3-3-3	NZ_GL379784.1	粘金黄杆菌 <i>C.gleum</i>	99	KU601316		黄杆菌属 <i>Chryseobacteri</i>	粘金黄杆菌 <i>C.gleum</i>
	W-3-6	W-N-3-1-3	NC_008027.1	嗜虫假单胞菌 <i>P.entomophila</i>	99	KU601313		假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	嗜虫假单胞菌 <i>P.entomophila</i>
W-4	W-4-1	W-N-4-1-1	NC_014103.1	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>	100	KU570361	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>
		W-N-4-1-4			99	KU570363			
	W-4-2	W-N-4-3-2	NZ_CCMN01000022.1	海水芽孢杆菌 <i>B.aquimaris</i>	99	KU570365			海水芽孢杆菌 <i>B.aquimaris</i>
	W-4-3	W-N-4-1-2	NC_004722.1	蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>	99	KU570362			蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>
	W-4-4	W-R-4-3-1	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>	99	KU570381	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>
	W-4-5	W-T-4-3-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>	99	KU570377		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>
W-5	W-5-1	W-N-5-1-1	NC_009848.1	短小芽孢杆菌 <i>B.pumilus</i>	99	KU570367	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	短小芽孢杆菌 <i>B.pumilus</i>
	W-5-2	W-N-5-2-1	NC_014103.1	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>	99	KU570370			巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>
	W-5-3	W-R-5-3-3	NZ_CP007557.1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>	99	KU570383	变形菌门 Proteobacteria	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C.freundii</i>
	W-5-4	W-T-5-3-1	NC_008570.1	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>	99	KU570378		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	嗜水气单胞菌 <i>A.hydrophila</i>
		W-T-5-3-2			99	KU570379			

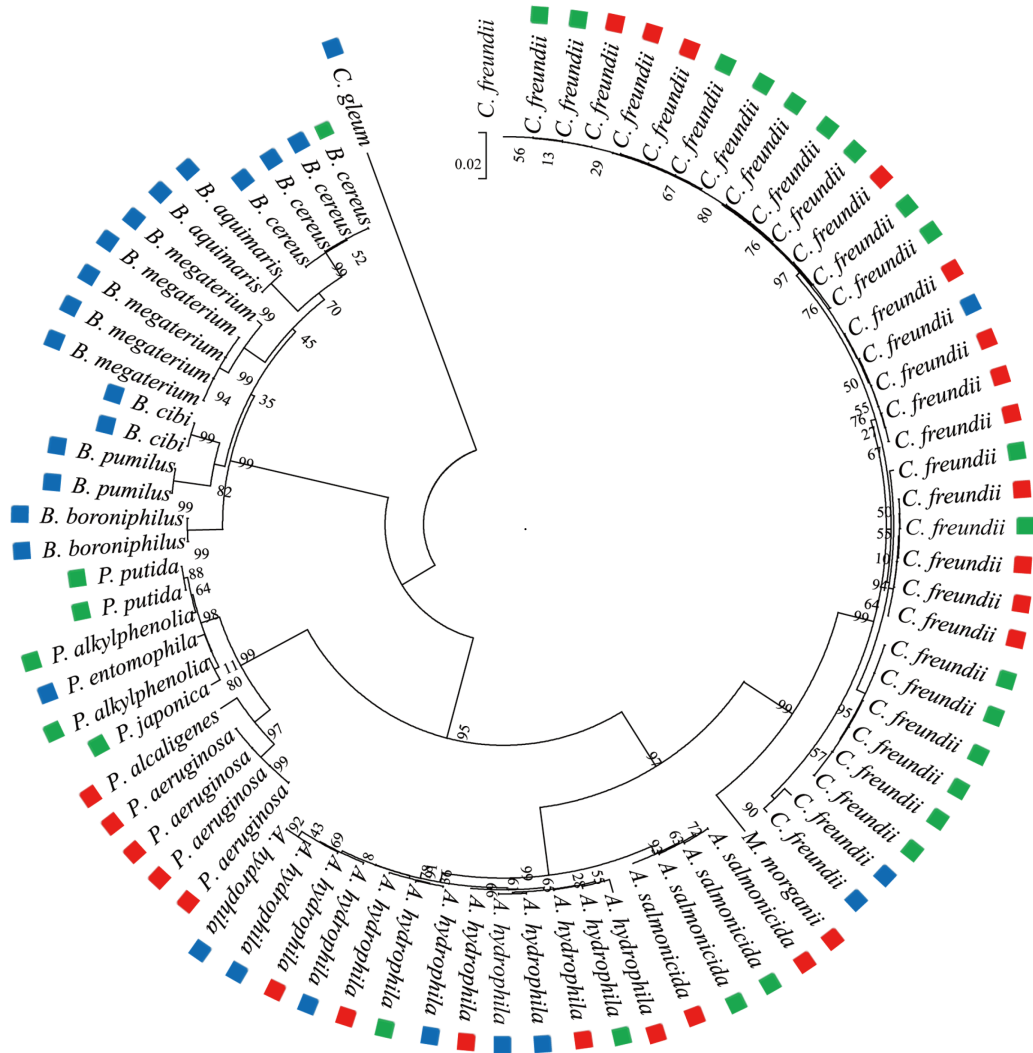


图 4 基于16S rRNA基因序列的不同样品来源的可培养优势细菌NJ系统进化树

■肠道; ■鳃; ■养殖水体

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the culture-based dominant bacteria from different samples

■intestine; ■gill; ■aquacultuer water

不同养殖池塘的养殖对象及同一养殖池塘的不同个体间, 均存在个体差异。裴素蕊等^[3]研究发现, 虾青素在体内的积累达到上限后可能通过代谢将多余的虾青素排出体外, 维持体内虾青素的动态平衡。若持续增加虾青素的含量, 肠道内可培养的优势细菌数量不会随添加量的增加和添加时间的延长而持续上升。肠道微生物在宿主肠道发育、营养状况、免疫应答和抗病力方面有重要作用。目前, 引起中华绒螯蟹的病原菌主要有嗜水气单胞菌^[24]和弧菌^[25], 本实验也在中华绒螯蟹肠道和鳃组织样品中分离到了嗜水气单胞菌和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)

这2种潜在致病菌。目前虽没有绿脓杆菌和摩氏摩根菌引致蟹类疾病报道, 但这2种细菌对其他动、植物以及人类而言是非常严重的条件致病菌^[26-27], 实验发现雄性中华绒螯蟹肠道样品中也存在这2种优势菌, 应当引起关注。当饲料中虾青素含量在26.60~75.35 mg/kg时, 潜在致病菌数量随虾青素含量的增加而减少; 当饲料中虾青素含量为75.35 mg/kg时, 肠道可培养的潜在致病菌的数量最少, 为 1.67×10^5 cfu/g。本实验对不同虾青素含量饲料投喂的中华绒螯蟹进行的嗜水气单胞菌攻毒试验发现, 虾青素含量为41.26 mg/kg饲料投喂的雄性中华绒螯蟹的存活率最

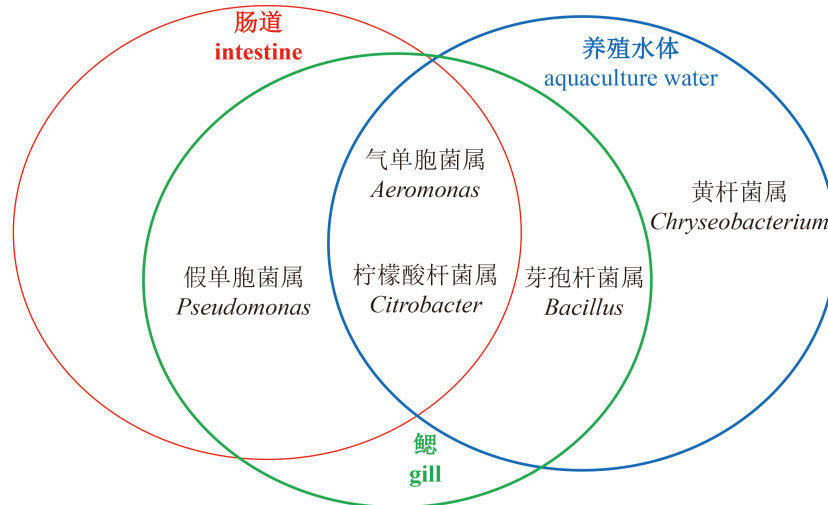


图5 不同样品来源的可培养优势细菌属水平之间的关系

Fig. 5 The relationship between the culture-based dominant bacteria at the genus level from different samples

高，而此时肠道可培养细菌总数以及肠杆菌数量最低，其潜在致病菌数量却仅低于第4#组，并且在对应的养殖水体中，潜在致病菌数量最高，说明肠道菌群与宿主的抵抗力以及养殖水体对肠道菌群的组成均有一定的影响，在一定程度上说明了中华绒螯蟹体内细菌与抗病力之间的联系。但除了数量关系之外，发现水体中占优势的潜在致病菌种类较单一，为气单胞菌属的嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌，而肠道优势菌的种类最丰富。早在1992年，Olsson等^[20]的研究中就发现在成年大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和黄盖鲈(*Limanda limanda*)的肠黏膜和皮肤黏膜中分离得到的多株细菌可抵制病原菌溶藻弧菌(*Vibrio anguillarum*)的入侵。研究表明，肠道微生物群落多样性高、稳定性高和恢复力强^[28]，与宿主有着互惠共生的关系，可促进寄主对营养盐的吸收和刺激免疫系统应答及疾病的预防^[29-30]。因此，推测中华绒螯蟹肠道内优势菌群的多样性以及水体中数量较多，但种类较单一的气单胞菌属潜在致病菌的存在，使其自身对嗜水气单胞菌的免疫力得到增强，因而在用相同的病原菌攻毒感染时，能够获得较高的保护率，符合免疫致敏(immune priming)现象^[31]，而其是否对其他的病原也有相似的抵抗力，有待进一步研究。5组不同虾青素含量饲料投喂的中华绒螯蟹养殖水体中的可培养细菌总数和致病菌数量都没有显著的差异，一方面可能由于水体面积太大，降低了饲料中虾青素的影

响；另一方面，养殖水体中的物理、化学及生物之间的相互作用更为复杂多变，难以就单一因素的变化做出线性的反应。

比较以往同样采用传统细菌分离培养法分析水生动物肠道微生物的研究结果发现，假单胞菌属、希瓦氏菌属、肠杆菌属、气单胞菌属和柠檬酸杆菌属为鱼类和虾类肠道的常见菌属，其中，假单胞菌属和气单胞菌属为甲壳纲动物肠道内的常见菌属^[32-34]。宛立等^[35]报道健康养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道内优势菌属为气单胞菌属；王祥红等^[36]发现弧菌属和发光杆菌属(*Photobacterium*)为野生健康中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)成虾肠道中的优势菌属；狄盼盼等^[37]研究表明，太湖养殖的雌性中华绒螯蟹肠道内以变形菌门、厚壁菌门以及拟杆菌门的细菌为主，与Li等^[18]对野生及池塘养殖中华绒螯蟹的研究结果相似；吴韬等^[14]研究显示，投喂果胶和木聚糖的中华绒螯蟹的肠道菌群主要由变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门这4个门类的细菌组成。本研究结果与上述结果部分相同，说明变形菌门是雌性和雄性中华绒螯蟹肠道中共有的细菌，并且为育肥期的雄性中华绒螯蟹肠道的最主要优势定殖菌群；不同之处主要是各自的实验方法、样品来源、投喂饲料、养殖环境等不同所造成的。本研究结果进一步丰富了对中华绒螯蟹肠道菌群的了解。

从肠道、鳃部和养殖水体的共有菌属来看，

三者之间确实存在相同的菌属,可能的原因包括:①水体中的菌群通过鳃部进行气体交换时进入体内,从而影响肠道菌群的组成;②通过进食,从口器到消化道,在肠道定殖下来,成为肠道菌群的一部分。由于鳃是呼吸和渗透压调节的器官^[38],可直接与外界环境相接触,受水环境影响较大,所以,鳃部和水环境中的共有菌多于鳃部和肠道的共有菌。从可培养的优势细菌组成方面来看,鳃部和肠道组成极为相似,均由柠檬酸杆菌属、气单胞菌属和假单胞菌属组成,同时,在鳃部也存在与养殖水体中一致的芽孢杆菌属,但种类少于养殖水体;肠道中外排分泌物,也会影响水体的菌群组成。由此可以说明,肠道中可培养优势菌群受水体和食物的双重、双向影响,均经由鳃以及口器发挥作用,这也间接说明,投喂不同虾青素含量的饲料对中华绒螯蟹肠道和鳃部可培养的优势细菌的组成和数量存在一定的影响,从而影响其健康及抗病力。

为了在源头上控制水产品的安全,生态防治的健康理念越来越受到普遍关注与应用。通过在饲料中添加特定的成分来提高机体的抵抗力,具有一定的科学价值和实际应用价值。本研究丰富和发展了中华绒螯蟹肠道菌群的信息,提高了对中华绒螯蟹肠道菌群的认识,并将虾青素、水体、养殖对象三者之间的动态变化联系起来,为中华绒螯蟹饲料中虾青素合适的添加量提供了科学依据,并为进一步发展微生物制剂来调控蟹体内的细菌数量,提高养殖动物的存活率和生长速度奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 郭春雨. 虾青素对中华绒螯蟹的影响及作用机理[D]. 保定: 河北大学, 2007.
- Guo C Y. The effect and mechanism of astaxanthin to *Eriocheir sinensis*[D]. Baoding: Hebei University, 2007 (in Chinese).
- [2] 温为庚, 林黑着, 吴开畅, 等. 饲料中添加虾青素对斑节对虾生长和免疫指标的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(3): 144-146.
- Wen W G, Lin H Z, Wu K C, et al. Effects of dietary with astaxanthin on growth and immunological parameters of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2011, 50(3): 144-146 (in Chinese).
- [3] Yi X W, Xu W, Zhou H H, et al. Effects of dietary astaxanthin and xanthophylls on the growth and skin pigmentation of large yellow croaker *Larimichthys croceas*[J]. Aquaculture, 2014, 433: 377-383.
- [4] 裴素蕊, 管越强, 马云婷. 饲料中添加虾青素对凡纳滨对虾生长、存活和抗氧化能力的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(3): 126-129.
- Pei S R, Guan Y Q, Ma Y T. Effects of dietary supplementation of astaxanthin on growth, survival and antioxidant capacity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Fisheries Science, 2009, 28(3): 126-129 (in Chinese).
- [5] 王红霞, 杨雯, 田洪, 等. 雨生红球藻中虾青素的提取及稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(2): 101-106.
- Wang H X, Yang W, Tian H, et al. Extraction and stability research of astaxanthin from *H. pluvialis*[J]. China Food Additives, 2015(2): 101-106 (in Chinese).
- [6] 李晓晖, 许志强, 葛家春, 等. 长江水系中华绒螯蟹种质资源研究进展[J]. 水产养殖, 2009, 30(10): 42-47.
- Li X H, Xu Z Q, Ge J C, et al. Advances in germplasm research of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* originated from the Yangtze River[J]. Journal of Aquaculture, 2009, 30(10): 42-47 (in Chinese).
- [7] Zhang Y, Zhao J M, Zhang H, et al. The involvement of suppressors of cytokine signaling 2 (SOCS2) in immune defense responses of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 42-48.
- [8] Sun S M, Chen L Q, Qin J G, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of copper-binding protein hemocyanin subunit in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1222-1228.
- [9] 龚志, 伊淑平, 孔丽, 等. 3种类胡萝卜素源对中华绒螯蟹体色改善效果的比较研究[J]. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2408-2413.
- Gong Z, Yin S P, Kong L, et al. Comparison of the improvement effect on body colour of Chinese mitten crab caused by three carotenoid sources[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(8): 2408-2413 (in Chinese).
- [10] Li Q, Xie J, He L, et al. Identification of ADAM10 and ADAM17 with potential roles in the spermatogenesis of

- the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Gene*, 2015, 562(1): 117-127.
- [11] Chaiyapechara S, Rungrasamee W, Suriyachay I, *et al.* Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(4): 938-953.
- [12] Liu H D, Wang L, Liu M, *et al.* The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses[J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1-4): 32-36.
- [13] 樊英, 李乐, 于晓清, 等. 免疫增强剂对仿刺参肠道微生物的影响[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(2): 91-96.
Fan Y, Li L, Yu X Q, *et al.* Effect of immunostimulants on intestinal microorganisms of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(2): 91-96 (in Chinese).
- [14] 吴韬, 张振龙, 蔡春芳, 等. 果胶和木聚糖对中华绒螯蟹肠道菌群结构的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(4): 745-753.
Wu T, Zhang Z L, Cai C F, *et al.* The effect of pectin and xylan on intestinal microflora structure of Chinese mitten crab[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(4): 745-753 (in Chinese).
- [15] Olmos J, Ochoa L, Paniagua-Michel J, *et al.* Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(6): 1119-1132.
- [16] Supamattaya K, Kiriratnikom S, Boonyaratpalin M, *et al.* Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Aquaculture*, 2005, 248(1-4): 207-216.
- [17] Niu J, Wen H, Li C H, *et al.* Comparison effect of dietary astaxanthin and β -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition[J]. *Aquaculture*, 2014, 422-423: 8-17.
- [18] Li K, Guan W, Wei G, *et al.* Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(3): 675-682.
- [19] Chen X B, Di P P, Wang H M, *et al.* Bacterial Community associated with the intestinal tract of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) farmed in Lake Tai, China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4). doi: 10.1371/journal.pone.0123990.
- [20] Olsson J C, Westerdahl A, Conway P L, *et al.* Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(2): 551-556.
- [21] Staley J T, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats[J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1985, 39(1): 321-346.
- [22] Vartoukian S R, Palmer R M, Wade W G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(1): 1-7.
- [23] Ringø E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish: A review[J]. *Aquaculture*, 1998, 160(3-4): 177-203.
- [24] 赵大显, 陈敏文, 江坤, 等. 嗜水气单胞菌诱导中华绒螯蟹消减文库的构建及初步分析[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(2): 398-403.
Zhao D X, Chen M W, Jiang K, *et al.* Construction and primary analysis of suppression subtractive hybridization library of *Eriocheir sinensis* by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(2): 398-403 (in Chinese).
- [25] 房海, 陈翠珍, 张晓君, 等. 中华绒螯蟹弧菌病及病原检验[J]. *河北科技师范学院学报*, 2008, 22(2): 1-6.
Fang H, Chen C Z, Zhang X J, *et al.* Examination of vibriosis and its pathogen from crab (*Eriocheir sinensis* L.)[J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2008, 22(2): 1-6 (in Chinese).
- [26] Schuster M, Greenberg E P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(2-3): 73-81.
- [27] 孔蕾, 朱凝瑜, 贝亦江, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)的鉴定及致病性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 722-727.
Kong L, Zhu N Y, Bei Y J, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Morganella morganii* isolates from Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013,

- 44(3): 722-727 (in Chinese).
- [28] Lozupone C A, Stombaugh J I, Gordon J I, *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota[J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 220-230.
- [29] 陈丹丹, 顾胜华, 张金娜, 等. 肠道菌群对免疫系统的影响及其群落分析方法[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(3): 542-546.
- Chen D D, Gu S H, Zhang J N, *et al.* Effect of intestinal microbes on the immune system and the latest research methods[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(3): 542-546 (in Chinese).
- [30] 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(3): 519-526.
- Gao Q X, Wu T X, Wang J B. Advance in research on symbiotic relationship between intestinal bacterial and their host[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(3): 519-526 (in Chinese).
- [31] Moret Y. ‘Trans-generational immune priming’: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*[J]. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2006, 273(1592): 1399-1405.
- [32] Horsley R W. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis[J]. *Journal of Fish Biology*, 1977, 10(6): 529-553.
- [33] Cheesman S E, Guillemin K. We know you are in there: Conversing with the indigenous gut microbiota[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(1): 2-9.
- [34] Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman D A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 811-818.
- [35] 宛立, 王吉桥, 高峰, 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析[J]. *水产科学*, 2006, 25(1): 13-15.
- Wan L, Wang J Q, Gao F, *et al.* Bacterial flora in intestines of white leg shrimp (*Penaeus vannamei* Booen)[J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(1): 13-15 (in Chinese).
- [36] 王祥红, 李会荣, 张晓华, 等. 中国对虾成虾肠道微生物区系(英文版)[J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(3): 493-498.
- Wang X H, Li H R, Zhang X H, *et al.* Microbial flora in the digestive tract of adult Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*)[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(3): 493-498.
- [37] 狄盼盼, 陈小兵, 孙国伟, 等. 养殖中华绒螯蟹肠道内优势细菌群组成分析[J]. *微生物学杂志*, 2014, 34(1): 58-61.
- P P, Chen X B, Sun G W, *et al.* Constitution analysis of intestinal dominant bacteria community in cultured Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 34(1): 58-61 (in Chinese).
- [38] Wang Y R, Li E C, Yu N, *et al.* Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37316.

Effect of dietary astaxanthin on culture-based dominant bacterial community isolated from the intestinal tract and gills of male Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

MA Wenyuan¹, WU Xugan^{1,2}, ZHANG Xiaoming¹, ZHAO Qing², LIU Can²,
LONG Xiaowen³, CHENG Yongxu^{2,3}, ZHANG Qinghua^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is one of the important economic species of freshwater aquaculture in China. Dietary astaxanthin affects the number and composition of culture-based dominant bacteria from intestinal tract and gills, which is closely linked to the body's immunity. In order to realize the relationship between dietary astaxanthin and the balance of bacteria in intestinal tract and gills, five diets with various concentration astaxanthin (0.00, 26.60, 41.62, 81.37 and 75.35 mg/kg, respectively) were fed to adult male crabs for 70 days. The dominant bacteria number and composition of five crab groups were measured by culture-based enumeration techniques, and then the isolates were sequenced by 16S rRNA gene analysis. A total of 106 bacterial strains were isolated from the intestinal tract, gills and aquaculture water. 92 bacterial strains were dominant bacteria, of which 29 bacterial strains were from intestinal tract, 32 bacterial strains from gills and 31 bacterial strains from aquaculture water. At the genus level, the dominant bacteria were *Citrobacter*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* in the intestinal tract, by contrast, the dominant bacteria were *Citrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* in the gill, and the dominant bacteria were *Bacillus*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* and *Chryseobacterium* in the aquaculture water. The total number of culture-based dominant bacteria in intestinal tract was the highest (1.06×10^8 cfu/g) in group 2. The number of potential pathogenic bacteria of group 5 (75.35 mg/kg) was significantly decreased in intestinal tract. However, the total number of dominant bacteria of group 5 was significantly higher than the other four groups in the gill, and the numbers of dominant bacteria had no significant difference in all five groups in aquaculture water. To conclude, dietary astaxanthin with various concentrations could significantly affect the culture-based dominant bacteria composition of intestinal tract and gill in male *E. sinensis*. The number of potentially pathogenic bacteria in intestinal tract and gills accounted for high proportion in group 3. This study for the first time analyzed the effect of astaxanthin on number and composition of culture-based dominant bacteria of intestinal tract and gills in male Chinese mitten crab, and discussed the relationship between concentration of dietary astaxanthin, aquaculture water and the number of culture-based dominant bacteria from intestinal tract and gill, and the results may provides a theoretical basis for *E. sinensis* diet exploitation and bacterial flora control in the future.

Key words: *Eriocheir sinensis*; astaxanthin; intestinal tract; gill; aquaculture water; dominant bacteria

Corresponding author: ZHANG Qinghua. E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

Funding projects: Capacity Building Project for the Local University from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (13320502100); Innovation Fund for Small and Medium-Sized Technology-Based Firms from Ministry of Science and Technology of China (14C26213201214); Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding (ZF1206); Science and Technology Commission of Shanghai Municipality16DZ2281200)