

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17180

玉米蛋白粉对大黄鱼生长、肠道组织结构及肠道菌群的影响

何娇娇, 王萍, 冯建, 娄宇栋

浙江海洋大学 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点室, 浙江 舟山 316022

摘要: 为了探讨玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生长、肠道组织结构及肠道微生物菌群的影响, 进行了为期 8 周的生长实验。以初始体重为(10.49±0.03) g 的大黄鱼幼鱼为研究对象, 用玉米蛋白粉分别替代基础饲料(含 40%鱼粉)中 0%(FM, 对照组)、15%(CGM15)、30%(CGM30)、45%(CGM45)、60%(CGM60)、75%(CGM75) 的鱼粉, 配制 6 种等氮(粗蛋白含量 45%)等脂(粗脂肪含量 10%)的实验饲料。56 d 投喂实验结束后, 各处理组幼鱼的存活率与特定生长率以及饲料系数等指标均无显著差异($P>0.05$)。从肠道组织学发现, 各处理组与对照组(FM)的幼鱼肠道组织结构肠黏膜、皱襞高度、杯状细胞个数均无显著差异性($P>0.05$), 但 CGM60 组的幼鱼部分肠黏膜上皮细胞被破坏, 上皮细胞排列紊乱, 纹状缘出现缺刻, 肠绒毛部分出现脱落或破损; CGM75 组的幼鱼肠道的皱襞高度变短, 皱襞密度降低, 皱襞个数减少。选取 FM、CGM15(生长相对较好)和 CGM75(生长相对较差)三组运用 Illumina-Mi Seq 高通量测序技术分析幼鱼肠道菌群的物种丰富度指数(chao1)、香农指数(Shannon)、辛普森指数(Simpson)和覆盖率(good coverage)均无显著差异($P>0.05$); 基于门水平, FM、CGM15 和 CGM75 组的幼鱼肠道细菌中优势菌群为厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)。而在属水平, 类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、嗜碱菌属(*Alkaliphilus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)为其优势菌群。分析属水平差异菌属发现, 与 FM 组相比较, CGM15 和 CGM75 组均显著增加了链球菌属(*Streptococcus*)的物种丰度($P<0.05$); 与 FM 组相比, CGM15 组显著降低了德沃斯氏菌(*Devosia*)和纤维弧菌属(*Cellvibrio*)的物种丰度($P<0.05$); 与 FM 组相比, CGM75 组显著增加了葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的物种丰度($P<0.05$)。综上所述, 玉米蛋白粉替代鱼粉达 45%时对大黄鱼幼鱼的生长、肠道组织结构及肠道优势菌群均影响不大。

关键词: 大黄鱼; 玉米蛋白粉; 生长; 肠道组织结构; 高通量测序; 肠道细菌

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)02-0361-12

生活在海洋中的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)主要以捕获活的糠虾类和桡足类为食, 活跃的捕获运动消耗能量, 减少脂肪堆积使其肉质鲜嫩^[1]。而网箱养殖使得鱼体能量消耗减少, 脂肪堆积, 味道不够鲜美。提高养殖大黄鱼肉质质量, 可以从养殖饲料方面着手。本研究以来源稳定、价格低廉、不含抗营养因子、蛋白质含量达 60%~70% 的玉米蛋白粉为主要蛋白源, 基于其氨基酸不平衡的缺点, 本实验中添加了适量的晶体氨基酸,

以期尽可能提高玉米蛋白粉替代饲料鱼粉蛋白的比例, 同时降低养殖成本^[2]。

肠道不仅是水生动物消化吸收的重要器官, 在水生动物生长繁育等重要的生命过程中也起到举足轻重的作用^[3]。国内外不乏对鱼类消化道组织学的研究, 如代伟伟等^[4]研究复合植物蛋白源替代鱼粉比例不超过 60%时, 对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Güntuer)后肠组织结构几乎没有影响, 而 PP80 组后肠绒毛出现严重损伤现

收稿日期: 2017-05-03; 修订日期: 2017-06-12.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31602205); 国家海洋公益性行业科研专项(201505025); 浙江省自然科学基金重点基金(Z16E0-90006); 浙江省重中之重学科开放基金(XKZSC1406); 舟山市海洋专项(2015C41001); 浙江海洋大学重中之重学科项目(20161105).

作者简介: 何娇娇(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物养殖学. E-mail: 915316064@qq.com

通信作者: 王萍, 副教授, 硕士生导师. E-mail: 17855848289@163.com

象。Murray 等^[5]研究报道,在庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*, L.) 饲料中添加 30%的豆粕后,庸鲽后肠道黏膜固有层及后肠形态均未受到影响。研究表明,饲料中植物蛋白源替代鱼粉会影响鱼类肠道组织结构,影响程度因不同植物源种类、替代水平和鱼种类而存在差异。

鱼类肠道微生态系统中,肠道结构是否损坏及肠道微生物是否维持稳态,直接影响着鱼体的消化吸收、防御及生长发育^[6]。研究表明,鱼类消化道菌群结构的形成与饵料成分紧密相关^[7]。通过传统方法 PCR-DGGE 分析了不同饵料对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肠道菌群的影响^[8]。由于传统的研究方法具有一定的局限性,使得高通量测序技术成为未来研究微生物多样性最核心的技术之一。它以测序通量大、测序深度广及准确度高等优点突破了传统方法中难以深入认识菌群结构组成及多样性的瓶颈^[9]。最近,以 Roche 454 和 Illumina Mi Seq 为代表的高通量测序平台也开始用于水产动物肠道菌群的研究,如 Zhang 等^[10]比较了不同脂肪源饲料对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道菌群结构的影响;职通瑞^[11]研究了在饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响;张正等^[12]研究了半滑舌鳎消化道、养殖环境及颗粒饵料中的菌群结构,并分析了它们之间的相关性。迄今,玉米蛋白粉对大黄鱼生长、肠道组织结构及肠道菌群影响的研究尚未见报道,本研究探讨不同玉米蛋白粉替代水平对大黄鱼生长、肠道组织结构及肠道菌群差异的影响,旨在为大黄鱼的生长及饲料研发提供参考和依据。

1 材料和方法

1.1 实验鱼及试验管理

实验大黄鱼幼鱼(10.49 ± 0.03) g 均采自浙江省象山县西沪港区养殖场的同一批鱼种,其试验管理参考冯建等^[13]的方法采用先暂养再分苗于 $1.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m} \times 2 \text{ m}$ 的浮式海水网箱中,随机分配到 18 个网箱,每个网箱放养 60 尾,每个处理 3 个重复组,养殖周期为 8 周。

1.2 饲料制作与实验设计

实验饲料组(表 1)中分别添加 0%(FM)、15%

(CGM15)、30%(CGM30)、45%(CGM45)、60%(CGM60)和 75%(CGM75)玉米蛋白粉替代鱼粉组的基础饲料,配制等氮等脂(蛋白水平为 45%,脂肪水平为 10%)的 6 种实验用配合饲料。此外,在基础饲料中以对照组(FM)的饲料赖氨酸、蛋氨酸含量为基准,分别添加相应水平的晶体赖氨酸和蛋氨酸,各实验组营养成分见表 2,其实验饲料制作及过程参照冯建等^[13]的方法。

1.3 样品采集与分析

参照冯建等^[13]方法对每个处理 3 个重复组样品进行 9 个样品的采集。应用 Nikon ECLIPSE Ci(显微镜型号)对组织切片进行观察拍照,运用 Image-Pro Plus6.0 软件测量分析肠组织的黏膜厚度,黏膜皱褶高度,并计数杯状细胞的数量及绒毛数量以及使用软件 SPSS20 对肠道指标进行方差分析。每个网箱另取 10 尾,将其后肠放于无菌 EP 管中于 -80°C 保存用于肠道菌群研究。

1.4 Illumina-Mi Seq 宏基因组测序

1.4.1 肠道菌群总 DNA 的提取及 PCR 扩增 肠道细菌总 DNA 的提取采用 bacterial DNA Kit 试剂盒(Omega, 美国),具体步骤参照试剂盒说明。以提取的基因组 DNA 作为模板进行 16S rRNA V4-V5 区扩增特异区域,其引物为 515F(5'-GTGCC-AGCMGCGCGG-3')和 907R (5'-CCGTCAATTC-MTTTTRAGTTT-3')。PCR 反应体系为($50 \mu\text{L}$): $10 \times$ PCR 缓冲液 $5 \mu\text{L}$, dNTPs mixture (各 2.5 mmol/L) $4 \mu\text{L}$, 引物(10 mmol/L)各 $2 \mu\text{L}$, 模板 DNA $1 \mu\text{L}$, Ex Taq 酶(TaKaRa, 大连) 1.5 U , 灭菌双蒸水补足至 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94°C 5 min ; 94°C 1 min , 55°C 45 s , 72°C 1 min , 35 个循环; 72°C 10 min (PCR 仪为 ABI Gene-Amp 9700 型)。扩增好的 DNA 序列经琼脂糖电泳检测阳性后交由南京集思慧远生物科技有限公司用 Illumina Miseq (Illumina, 美国)高通量测序技术进行序列测定和分析。

1.4.2 富集并扩增 DNA 文库 将每一个样品 DNA 等量混合后,采用标准的 Illumina Tru Seq DNA 文库制备实验流程构建所需的宏基因组上机文库,并在 Illumina-Mi Seq 基因组分析平台上进行 Barcoded Illumina Miseq 测序,采用 PE2500

表 1 实验饲料组成及营养成分
Tab. 1 Ingredients and nutrients of the experimental diets

原料 ingredient	饲料组 diet group					
	FM	CGM15	CGM30	CGM45	CGM60	CGM75
鱼粉 fish meal (Danish)	40.00	34.00	28.00	22.00	16.00	10.00
玉米蛋白粉 corn gluten meal	0.00	6.84	13.69	20.53	27.37	34.21
小麦蛋白粉 wheat gluten meal	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55
豆粕 soybean meal	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00
小麦淀粉 wheat-starch	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
鱼油 fish oil	1.96	2.20	2.44	2.86	2.91	3.34
大豆油 soybean oil	1.96	2.20	2.44	2.86	2.92	3.34
大豆卵磷脂 soy bean lecithin	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
维生素预混 ¹⁾ vitamin premix ¹⁾	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
矿物质预混 ²⁾ mineral premix ²⁾	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
赖氨酸 Lys	0.00	0.25	0.49	0.74	0.99	1.24
蛋氨酸 Met	0.00	0.07	0.14	0.20	0.27	0.34
氯化胆碱 choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	1.50	1.50	0.07	1.50	1.50	1.50
诱食剂 ³⁾ attractant ³⁾	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
纤维素 cellulose	8.93	7.29	7.09	3.66	2.39	0.38
总计 total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养成分 proximate composition						
粗蛋白 crude protein	45.26	45.28	44.63	46.21	45.99	46.26
粗脂肪 ether extract	10.54	10.73	10.65	11.34	10.61	11.23
灰分 ash	10.38	9.54	8.39	7.70	7.13	6.39

注: 1) 复合维生素(mg 或 g/kg 饲料): 胡萝卜素, 0.1 g; 维生素 D, 0.05 g; 生育酚, 0.38 g; 维生素 B1, 0.06 g; 维生素 B2, 0.19 g; 维生素 B6, 0.05 g; 氰钴素, 0.1 mg; 生物素, 0.01 g; 肌醇, 3.85 g; 尼克酸, 0.77 g; 泛酸, 0.27 g; 叶酸, 0.01 g; 氯化胆碱, 7.87 g; 纤维素, 1.92 g.
2) 复合矿物质(mg or g/kg 饲料): 氟化钠, 2 mg; 碘化钾, 0.8 mg; 氯化钴(1%), 50 mg; 硫酸铜, 10 mg; 硫酸铁, 80 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸锰, 60 mg; 硫酸镁, 1200 mg; 磷酸二氢钙, 3000 mg; 氯化钠, 100 mg; 沸石粉, 15.447 g.
3) 诱食剂: 甘氨酸和甜菜碱(1 : 2).
Note: 1) Vitamin premix (mg or g / kg diet): carotene, 0.1 g; vitamin D, 0.05 g; tocopherol, 0.38 g; vitamin B1, 0.06 g; vitamin B2, 0.19 g; vitamin B6, 0.05 g; cyanocobalamin, 0.1 mg; biotin, 0.01 g; inositol, 3.85 g; niacin acid, 0.77 g; pantothenic acid, 0.27 g; folic acid, 0.01 g; chloride choline, 7.87 g; cellulose, 1.92 g.
2) Mineral premix (mg or g/kg diet): NaF, 2 mg; KI, 0.8 mg; CoCl₂·6H₂O (1%), 50 mg; CuSO₄·5H₂O, 10 mg; FeSO₄·H₂O, 80 mg; ZnSO₄·7H₂O, 50 mg; MnSO₄·H₂O, 60 mg; MgSO₄·7H₂O, 1200 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 3000 mg; NaCl, 100 mg; zoelite, 15.447 g.
3) Attractant: glycine and betaine (1 : 2).

测序策略, 每个样品完成 1 个 PE 的文库构建, PE library Insert size 为 500 bp; 每个样品产出最低不少于 2 万对 reads, Clean date 测序质量 Q30>75%。实验流程为: 在 3'-5'核酸外切酶及聚合酶的共同作用下, 修复带有突出末端的 DNA 片段, 在修复平整的 DNA 片段 3'末端引入单碱基 A, 接头的 3'末端含有单碱基 T, 从而保证 DNA 片段和接头能通过 A 和 T 配对连接。利用 PCR 选择性地富集两端连有接头的 DNA 片段, 同时扩增 DNA 文库。

1.5 数据处理及统计分析
1.5.1 生长数据处理 各生长参数按下列公式计算:
存活率(survival rate, SR) = $N_t/N_0 \times 100\%$;
特定生长率(specific growth rate, SGR) = $100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$;
增重率(weight gain rate, WGR)= $(W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$;
饲料系数(feed conversion ratio, FCR) = $(T - S) / (W_t - W_0) \times 100\%$;

表 2 实验饲料氨基酸组成
Tab. 2 Amino acid composition of the experimental diets

必需氨基酸 EAA	饲料组 diet group						%, 干重 DW
	FM	CGM15	CGM30	CGM45	CGM60	CGM75	
苏氨酸 Thr	3.60	3.31	3.21	3.13	2.97	2.65	
缬氨酸 Val	4.70	4.49	4.37	4.24	4.06	3.76	
蛋氨酸 Met	2.13	2.10	2.10	2.08	1.89	1.95	
异亮氨酸 Ile	4.30	4.13	4.05	3.90	3.73	3.47	
亮氨酸 Leu	8.70	9.55	10.66	11.50	12.37	12.86	
色氨酸 Try	—	—	—	—	—	—	
苯丙氨酸 Phe	4.21	4.18	4.49	4.61	4.73	4.67	
赖氨酸 Lys	6.18	5.58	5.14	4.67	4.41	3.85	
组氨酸 His	1.99	1.70	1.88	1.84	1.78	1.53	
精氨酸 Arg	5.76	5.06	4.83	4.42	4.04	3.72	
合计 total	41.57	40.1	40.73	40.39	39.98	38.46	
非必需氨基酸 NEAA							
天门冬氨酸 Asp	8.36	7.61	7.59	7.09	6.61	6.06	
丝氨酸 Ser	3.63	3.71	3.64	3.67	3.71	3.83	
谷氨酸 Glu	22.67	24.03	23.74	24.26	24.95	26.04	
甘氨酸 Gly	6.09	5.49	4.93	4.53	4.08	3.63	
丙氨酸 Ala	5.79	5.64	6.23	6.48	6.59	6.82	
胱氨酸 Cys	0.97	0.79	0.67	0.79	0.70	0.78	
脯氨酸 Pro	6.56	8.40	7.57	7.60	8.06	9.33	
酪氨酸 Tyr	2.50	2.35	2.82	2.98	3.01	2.78	
合计 total	56.57	58.02	57.19	57.40	57.71	59.27	

上述公式中, W_0 、 W_t 分别表示实验鱼初始体重和终末体重; N_0 、 N_t 分别表示养殖实验开始时网箱中鱼的尾数和养殖实验结束时网箱中鱼的尾数; T 、 S 分别表示总饲料量和剩余饲料量, t 表示实验天数。

1.5.2 Illumina Miseq 测序数据处理 Illumina Miseq 测序所得原始测序序列经去除 primer 并按 barcode 切分, 同时进行质控, 过滤掉碱基平均质量值小于 20 的 reads; 序列长度小于 200 的 reads。用 usearch 软件对数据进行去嵌合体 and 聚类的操作。usearch 聚类时, 先将 reads 按照丰度从大到小排序, 通过 97% 相似度的标准聚类, 得到 OTU(Operational Taxonomic Units)。在聚类过程中利用 Denovo 方法去除嵌合体(chimeras)。接下来对每个样品的 tags 进行随机抽平处理, 并在各个水平上统计每个样品的群落组成。然后使用 Qiime

软件, 做 alpha 多样性指数的稀释曲线, 分别利用香农指数(Shannon)、辛普森指数(Simpson)和物种丰富度指数(chao1)公式计算细菌生态多样性指数; 利用 Mothur 软件制作柱状图、Venn 图及盒子图以作 OTU 分析。

采用 SPSS20.0 软件对文中所得数据进行单因素方差分析(ANOVA), 差异显著后进行 Tukey 多重比较, 显著性水平设为 $P<0.05$; 实验结果以平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 CGM 替代鱼粉对大黄鱼幼鱼生长性能和饲料利用的影响

从表 3 中可以看出, 各处理组中, 大黄鱼幼鱼存活率较高均在 93.89%~99.44% 范围内, 且各

处理组, 末体重、特定增长率、增重率、饲料系数等指标均无显差异($P>0.05$)。

2.2 玉米蛋白粉对大黄鱼幼鱼肠道形态的影响

饲喂不同水平的玉米蛋白粉 8 周后大黄鱼幼鱼后肠组织结构的影响结果如表 4 所示。观察大黄鱼幼鱼后肠的组织切片发现, 肠道组织结构分为:

黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层, 黏膜凸起形成皱襞。从肠道组织学发现, CGM15–CGM75 组与 FM 组(图 1)肠道组织结构肠黏膜、皱襞高度、杯状细胞个数均无显著差异性($P>0.05$), 但 CGM60 组中部分黏膜上皮细胞被破坏, 上皮细胞排列紊乱, 纹状缘出现缺刻, 肠绒毛部分出现脱落或破损;

表 3 玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼幼鱼生长的影响
Tab. 3 Effects of replacement of fish meal by CGM on the growth of juvenile *Larimichthys crocea*
 $n=5$; $\bar{x} \pm SE$; 干重 DW

项目 item	饲料组 diet group					
	FM	CGM15	CGM30	CGM45	CGM60	CGM75
初体重/g initial body weight	10.49±0.01	10.50±0.00	10.47±0.05	10.48±0.02	10.50±0.00	10.48±0.02
末体重/g final body weight	43.85±0.09	44.10±1.60	41.76±1.93	43.68±2.29	42.60±1.73	41.69±0.59
存活率/% SR	97.22±2.55	96.67±3.33	93.89±4.81	96.11±3.47	98.33±1.67	99.44±0.96
特定增长率/(%/d) SGR	2.55±0.01	2.56±0.07	2.47±0.08	2.55±0.09	2.50±0.07	2.47±0.02
增重率/% WGR	318.00±0.01	320.00±0.15	299.00±0.17	317.00±0.21	306.00±0.16	298.00±0.05
饲料系数 FCR	0.98±0.03	0.99±0.02	1.09±0.14	1.00±0.06	0.99±0.02	1.03±0.02

注: 每一行数据右上角字母不同, 表示差异显著($P<0.05$); 字母相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$).
Note: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). Values in the same row with the same or no superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

表 4 饲料中玉米蛋白粉对大黄鱼肠道显微结构指标的影响
Tab. 4 Effects of dietary corn gluten meal on the intestinal microscopic structure parameters of *Larimichthys crocea*
 $n=5$; $\bar{x} \pm SE$

组别 group	黏膜厚度/ μm mucosa thickness	皱襞高度/ μm mucosa fold height	杯状细胞数量/(个/根) gobletcell quantity
FM	97.53±12.92	4.43±0.47	1.03±0.23
CGM15	91.88±7.61	4.97±0.53	0.96±0.06
CGM30	106.42±7.39	4.04±0.20	1.99±0.56
CGM45	109.20±54.61	5.04±0.67	1.87±0.59
CGM60	117.04±11.07	4.32±0.20	2.67±1.43
CGM75	110.72±7.38	3.63±0.55	1.86±0.77

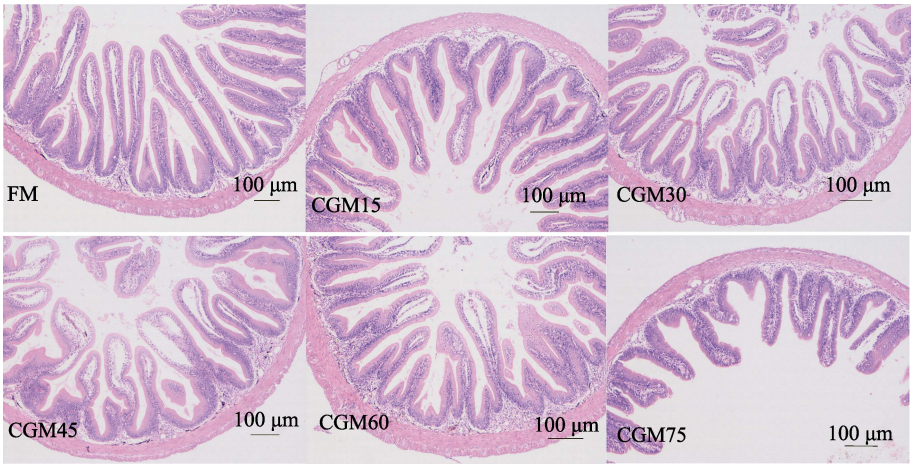


图 1 饲料中玉米蛋白粉对大黄鱼肠道形态的影响(后肠)
Fig. 1 Effects of corn gluten meal on the intestinal morphology of *Larimichthys crocea* (posterior intestine)

可以观察到 CGM75 组较对照组鱼体肠道的皱襞高度变短,且皱襞密度降低,皱襞个数减少。

2.3 玉米蛋白粉对大黄鱼幼鱼肠道菌群结构分析

2.3.1 16S rRNA 基因测序结果分析 利用 usearch 在 0.97 相似度下进行聚类,FM(TC)、CGM15(TB)和 CGM75(TW)9 个样品数据共产生 75 个 OTU。覆盖率(goods coverage)指数反映了测序的深度;指数均在 0.999 以上,说明测序深度已经基本覆

盖到样品中所有的物种。香农指数用于反映样品中菌群多样性指数,本实验 9 个样品起初曲线上升比较迅速,随着测序的深入,所有样品测序所得序列的数值升高直至曲线平滑,最后可以看到各样品曲线趋于平坦(图 2)。表明在测序的起始阶段,测序所得序列数远不足覆盖大黄鱼幼鱼后肠样品;但随着测序的深入,可以反映出大黄鱼幼鱼后肠样品中绝大多数菌种信息。

表 5 样品的菌群多样性指数
Tab. 5 Alpha-diversity of samples

样品 sample	alpha 多样性指数			
	chao1	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖率 good coverage
TC	56.86667	2.645153	0.772372	0.999515
TB	52.81429	2.672850	0.772760	0.999667
TW	70.80952	2.654244	0.773206	0.999379

注: TC 为对照组(FM)后肠样品 Cd34、Cd35、Cd36 各 alpha 多样性指数均值; TB 为 CGM15 组后肠样品 Cd37、Cd38、Cd39 各 alpha 多样性指数均值,其为生长相对最优组; TW 为 CGM75 组后肠样品 Cd49、Cd50、Cd51 各 alpha 多样性指数均值,其为生长相对最差组。
Note: The alpha diversity index mean value of Cd34, Cd35 and Cd36 indicates TC in control group; the alpha diversity index mean value of Cd37, Cd38 and Cd39 indicates TB in CGM15 which is the relatively best group; the alpha diversity index mean value of Cd49, Cd50 and Cd51 indicates TB in CGM75 which is the relatively worst group.

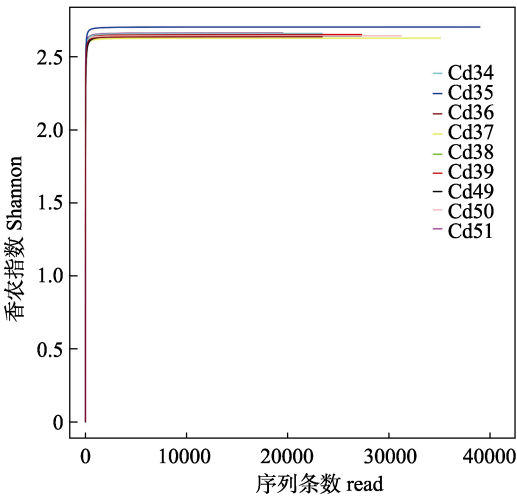


图 2 大黄鱼幼鱼后肠样品测序序列
稀释曲线(相似度: 97%)

Fig. 2 Delusion curve of sequenced reads in posterior intestine of large yellow croaker (similarity: 97%)

2.3.2 各样品中细菌多样性及相关性分析 3 组测序样品的序列进行比对,在生物分类学门的水平进行分类,其中 6 门如图 3 所示,它们分别是:变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、

放线菌门(Actinobacteria)和蓝藻门(Cyanobacteria)。其中厚壁菌门和变形菌门在大黄鱼幼鱼后肠肠道细菌菌群结构中占优势地位。

在属水平对微生物群落结构与不同样品间的差异进行分析,可以得到 19 个不同的属(图 3),其中 4 个属的细菌比例较高,分别为类芽孢杆(*Paenibacillus*)、嗜碱菌属(*Alkaliphilus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)。基于以上门、属水平分析表明,不同处理的大黄鱼幼鱼后肠肠道菌群中优势菌种类相同。

以各样品中分布的 OTU 数为计算依据,用 MOTHUR 软件中的 Venn 命令对各样品中菌群菌种的多样性进行分析并构建韦恩图(图 4)。依据图中的数据,仅从样品中细菌类别的多样性角度进行定性分析,不同处理组的大黄鱼幼鱼后肠肠道菌群结构具有一定的保守性。研究结果表明大黄鱼幼鱼后肠肠道内含物样品的 9 个克隆文库共计 75 个 OTU,其中 52 个共同 OTU,占三者 OTU 总数的 69.33%; TB 与 TC 共有 56 个 OTU,占两者 OTU 总数的 76.71%; TW 与 TC 共有 55 个 OTU,

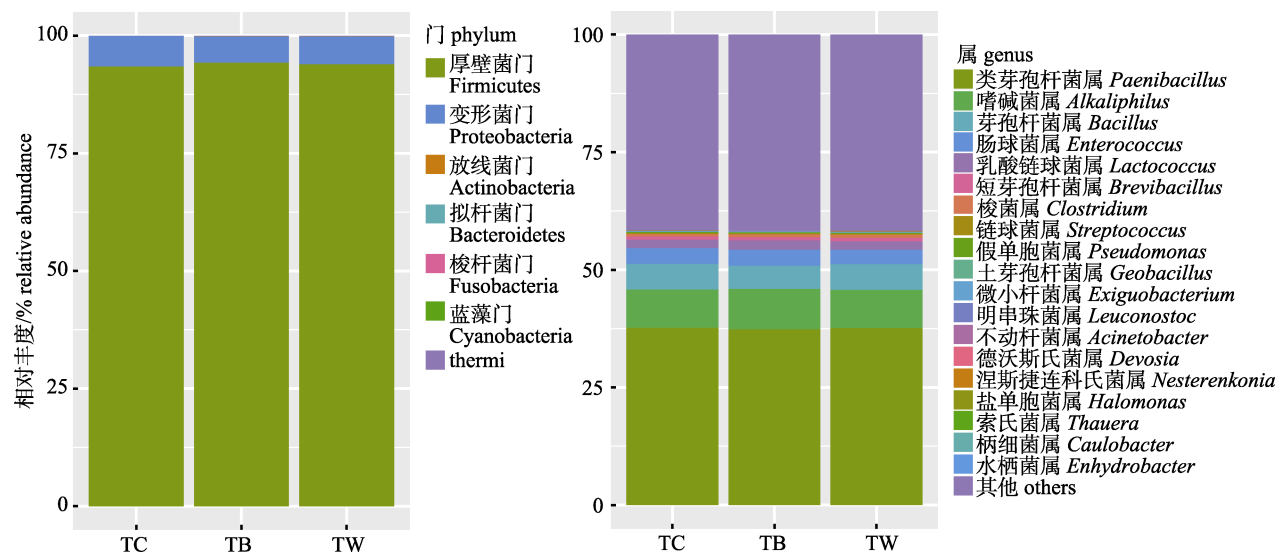


图 3 在生物分类学门(左图)、属(右图)的水平对组测序样品序列相对丰度
TC 为对照组(FM)后肠样品 Cd34、Cd35、Cd36 均值; TB 为 CGM15 组后肠样品 Cd37、Cd38、Cd39 均值, 其为生长相对最优组; TW 为 CGM75 组后肠样品 Cd49、Cd50、Cd51 均值, 其为生长相对最差组。
Fig. 3 The relative abundance of posterior intestine from large yellow croaker with different diets, by phylum (left) and genus (right)
The mean value of Cd34, Cd35 and Cd36 indicates TC in control group; the mean value of Cd37, Cd38 and Cd39 indicates TB in CGM15 which is the relatively best group in growth; the mean value of Cd49, Cd50 and Cd51 indicates TB in CGM75 which is the relatively worst group in growth.

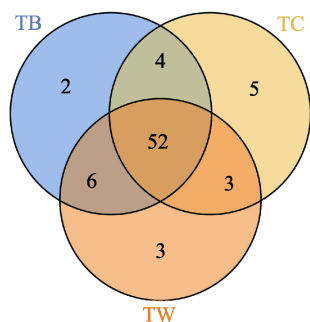


图 4 不同处理组的共同 OTU 分析
图中数字为各样本中的 OTU 数量. TC 为对照组(FM)肠道样品 Cd34、Cd35、Cd36 OTU 数量均值; TB 为 CGM15 组肠道样品 Cd37、Cd38、Cd39 OTU 数量均值, 其为生长相对最优组; TW 为 CGM75 组肠道样品 Cd49、Cd50、Cd51 OTU 数量均值, 其为生长相对最差组。
Fig. 4 Shared OTU analysis of different groups
The number in each figure is the OTU amount in different samples. The OTU number mean value of Cd34, Cd35 and Cd36 indicates TC in control group; the OUT number mean value of Cd37, Cd38 and Cd39 indicates TB in CGM15 which is the relatively best group in growth; the OUT number mean value of Cd49, Cd50 and Cd51 indicates TB in CGM75 which is the relatively worst group in growth.

占两者 OTU 总数的 75.34%; TB 与 TW 共有 58 个 OTU, 占两者 OTU 总数的 82.86%。从大黄鱼幼鱼后肠肠道样本的菌群相似性来看, TB 与 TW 两

个样品之间共有的 OTU 的比例比较高, 说明尽管是不同玉米蛋白粉替代水平的饲料, 其在相同养殖环境下大黄鱼幼鱼后肠肠道细菌群落的相似性比较高。

2.3.3 各处理在属水平的差异 本实验中如图 5 所示, 较 TC 组, TB 和 TW 组均显著增加了链球菌属(*Streptococcus*) 的物种丰度($P<0.05$); 与 TC 组相比, TB 组显著降低了德沃斯氏菌属(*Devosia*)和纤维弧菌属(*Cellvibrio*)的物种丰度($P<0.05$); 与 TC 组相比, TW 组显著增加了葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的物种丰度($P<0.05$)

3 讨论

3.1 玉米蛋白粉对大黄鱼幼鱼生长的影响

研究表明, 适口性、消化率和氨基酸是否平衡是影响水产动物对植物蛋白利用的主要因素^[14]。本实验中, 不同水平的玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼幼鱼存活率、增重率、特定生长率和饲料系数较对照组均无显著差异, 这与陈然等^[15]在玉米蛋白粉替代异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)饲料中 75%的鱼粉而不影响鱼的生长结果相似。刘

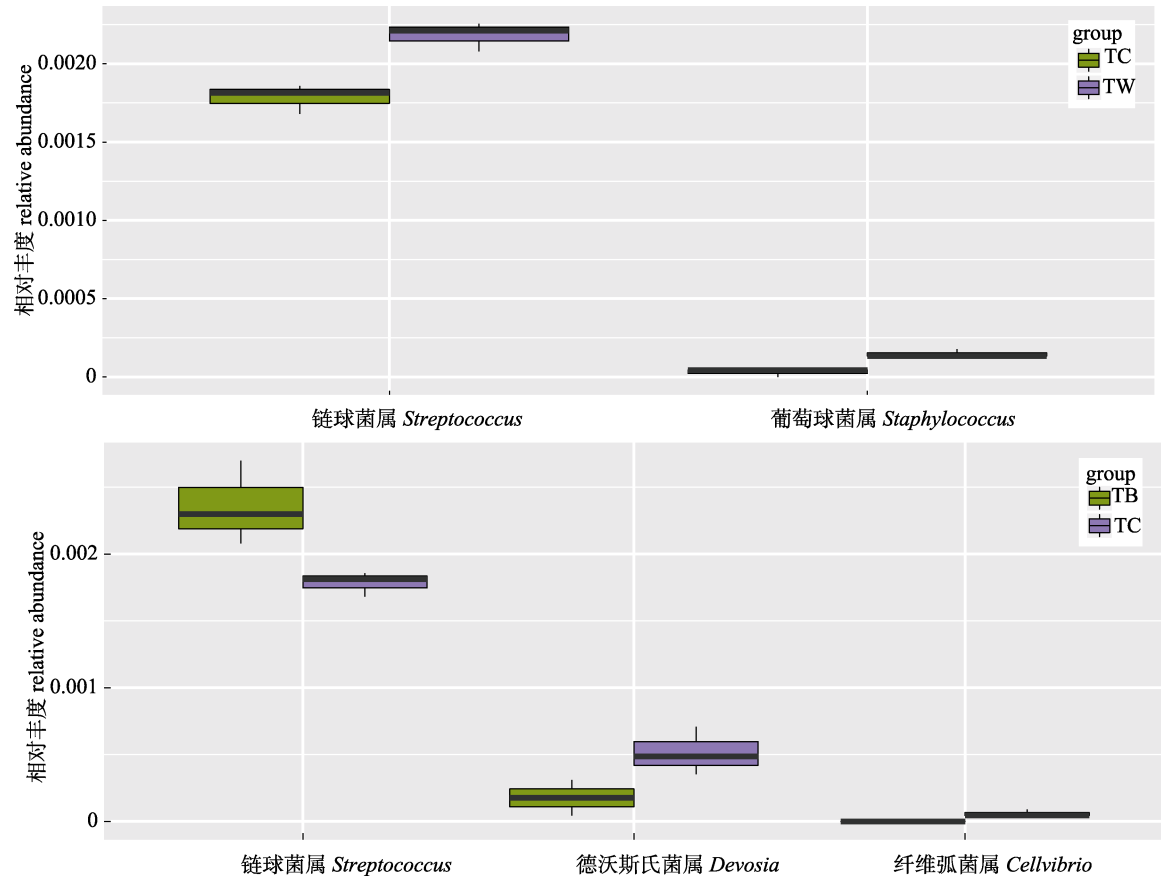


图 5 各处理相对丰度在属水平的差异比较

TC 为对照组(FM)肠道样品 Cd34、Cd35、Cd36 菌属相对丰度均值; TB 为 CGM15 组肠道样品 Cd37、Cd38、Cd39 菌属相对丰度均值, 其为生长相对最优组; TW 为 CGM75 组肠道样品 Cd49、Cd50、Cd51 菌属相对丰度均值, 其为生长相对最差组。

Fig. 5 Comparison of relative abundance among different treatments at genus level

The relative abundance mean value of Cd34, Cd35 and Cd36 indicates TC in control group. The relative abundance mean value of Cd37, Cd38 and Cd39 indicates TB in CGM15 which is the relatively best group in growth. The relative abundance mean value of Cd49, Cd50 and Cd51 indicates TB in CGM75 which is the relatively worst group in growth.

兴旺等^[16]、Regost 等^[17]用玉米蛋白粉替代鱼粉对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的研究表明, 玉米蛋白粉替代饲料中 25% 的鱼粉蛋白不影响大菱鲂的生长。本实验中添加了诱食剂和晶体氨基酸, 一方面改善了饲料的适口性, 未影响摄食量; 另一方面平衡了玉米蛋白粉中氨基酸, 提高了饲料的营养价值。研究表明, 鱼类能够有效利用晶体氨基酸来提高植物蛋白的利用, 从而不影响鱼类生长^[18]。

3.2 玉米蛋白粉对大黄鱼幼鱼肠道组织的影响

鱼类肠道是机体消化和吸收的结构基础, 当食物进入鱼体后, 在物理与化学协同作用下, 肠道对分解的小分子物质进行消化吸收。其肠壁的组织学结构包括黏膜、黏膜下层、肌层和浆层, 黏

膜包括了具有吸收作用的柱状上皮细胞和能分泌消化酶和黏液的杯状细胞。因此, 肠道结构是否完整对鱼类的消化能力有决定性的作用。本实验中, 各组肠道黏膜厚度、皱襞高度和单根绒毛上杯状细胞数量均不受玉米蛋白粉替代水平的影响, 但肠道组织切片 CGM60 组中表现出部分黏膜上皮细胞被破坏且上皮细胞排列紊乱, 纹状缘出现缺刻, 肠绒毛部分出现脱落或破损的现象。这与吴莉芳等^[19]用去皮豆粕替代鱼粉蛋白 60% 时, 埃及胡子鲶(*Clarias lazera*)的后肠肠道组织结构完整性被破坏, 部分肠绒毛脱落研究结果类似。单根绒毛杯状细胞数量各组均无显著差异, 但从 CGM30-CGM75 组可以看出其单根绒毛杯状细胞数量均要高于 FM 组和 CGM15 组, 这与邢秀苹^[20]

研究的不同豆粕替代量对黄金鲈(*Perca flavescens*)肠道形态结果中杯状细胞数量较对照组增加类似, 由于杯状细胞是肠道黏膜中一种典型的黏液细胞, 其主要分泌的黏液物质是黏蛋白, 而黏蛋白是一种能润滑肠道的糖蛋白, 对肠道上皮黏膜具有保护作用^[21], 因此推断鱼体肠道结构遭到损坏。不仅如此, 杯状细胞还产生三叶状蛋白, 这种蛋白对黏膜上皮细胞具有修复功能, 能够在细胞因子与生长因子的共同作用下, 加快上皮细胞的修复^[21]。因此, 杯状细胞的增多表明鱼体肠道黏膜的完整性受到了一定损伤。

皱襞是肠道黏膜向肠腔内折而成, 其形态与鱼的种类有关, 但其功能相似, 即皱襞是肠内消化吸收的主要场所, 皱襞高度与肠道的营养吸收面积紧紧相关, 皱襞越高, 面积越大就越有利于吸收^[22]。本实验中, CG-M75 组皱襞高度及皱襞密度均有所降低且皱襞高度显著低于 CG-M15 组。许多研究也有类似结果, 如林佳洁^[23]在研究发酵豆粕替代 70% 鱼粉蛋白时, 黄金鲫(*Carassius auratus*)后肠皱襞高度显著降低; 吕云云等^[24]在研究发酵豆粕对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)肠道结构的影响的结果表明, 高替代组皱襞高度下降且皱襞密度及个数均有所降低。这表明植物蛋白源中的某些抗营养因子会影响到肠道结构的完整性^[25]。然而, 玉米蛋白粉几乎不含抗营养因子, 而肠道受损可能的原因是由于小肠壁上皮细胞表面的特异性受体和玉米蛋白粉中的某些致敏原结合, 导致肠黏膜发生炎症^[26]。已有学者认为, 玉米蛋白粉中主要的蛋白是玉米醇溶蛋白, 玉米醇溶蛋白中含有大量的疏水性氨基酸, 其在多肽主链的螺旋结构较为稳定, 增大了醇溶蛋白被肠道吸收的难度, 可能会导致肠道黏膜的完整性被破坏^[27]。

3.3 玉米蛋白粉对大黄鱼幼鱼肠道微生物的影响

肠道菌群对肠道形态、营养吸收及代谢机制有其重要影响, 且处于动态平衡的有益菌与有害菌的正常分布是保证宿主健康生长的重要基础^[28]。因此, 建立健康的肠道微生物区系, 有助于提高水产动物的生产性能。本实验采用 Illumina 高通量测序技术比较了不同玉米蛋白粉替代鱼粉水平

对大黄鱼肠道细菌群落结构和多样性的影响, 发现处于门和属的分类水平上, 不同处理的大黄鱼肠道菌群中优势菌群种类相同, 其门水平上的优势菌门为厚壁菌门和变形菌门, 与 Wu 等^[29]研究脊椎动物肠道菌群的优势菌门相似。可以推测厚壁菌门和变形菌门为大黄鱼幼鱼肠道内的固有菌群; 其属水平上类芽孢杆菌属、嗜碱菌属、芽孢杆菌属、肠球菌属为优势菌属, 其中类芽孢杆菌属占据绝对优势。研究表明, 其具有芽孢杆菌的某些特性, 不仅在肠黏膜、肠绒毛等肠道发育方面有促进作用, 还能产生胞外酶有助于增强鱼体抗病和免疫的能力^[30]。本研究各处理组大黄鱼幼鱼肠道内大量类芽孢杆菌的分布在一定程度上缓解了肠道黏膜的破损和在营养代谢过程中可能起重要调控作用。通过韦恩图分析肠道菌群相似性发现不同替代水平的玉米蛋白粉 TB 组与 TW 组相似性均高于 FM 组与 TB 组、FM 组与 TW 组的相似性, 这与许多研究结果相似, 表明饵料成分越相近的处理组其幼鱼肠道菌群结构的相似性越高^[31-32]。尽管肠球菌属所占优势菌属的比例较低, 但能对淀粉及脂肪进行分解, 其功能作用不容忽视^[33]。基于优势菌门及优势菌属, 各处理组肠道菌群结构差异性不显著, 这可能是和定植在肠道中的优势菌群具有的宿主特异性有关。Michelle 等^[34]研究表明, 刚孵化的鱼仔其消化菌群就已经建立且在生长过程中优势菌群并不会发生明显的变化。在属水平上, TB 组与 TW 组的链球菌属丰度显著高于对照组 TC; TW 组的葡萄球菌属显著高于对照组 TC, 这与 Wong 等^[35]研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠道中链球菌和葡萄球菌的数量会随饲料水平的不同而变化结果类似。链球菌属与葡萄球菌属同属于厚壁门, 高玉米蛋白粉替代组此两种菌属均高于对照组, 可能与肠道蠕动速率相关, 其相关机制需进一步研究^[36]。纤维弧菌属和德沃斯氏菌属均属于变形菌门的不同纲, 其纤维弧菌属隶属于 γ -变形菌纲; 假单胞菌科, 本实验中最好组 TB 的纤维弧菌属丰度显著低于对照组 TC, 可能是与纤维弧菌属多存在于腐殖质环境中具有较强耐受性及具有降解纤维素的功能相关^[37]。

4 结论

相比于全鱼粉组,各替代组并没有发现大黄鱼幼鱼生长和存活率受到显著的不利影响,且基于玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼幼鱼肠道微生物影响,本次实验各处理大黄鱼幼鱼肠道优势菌群均为厚壁菌门和变形菌门,且具有相同的优势菌属,但从肠道组织学看,高于 60%的替代水平对大黄鱼幼鱼肠道结构产生不利影响。因此,本实验条件下,大黄鱼幼鱼饲料中可以使用玉米蛋白粉来替代 45%的鱼粉,既不影响大黄鱼幼鱼的生长和存活,也不影响其肠道组织结构及优势菌群变化。

参考文献:

- [1] Quan C G, Wang J, Ding S X, et al. Biochemical compositions of farmed *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2000, 19(2): 197-200. [全成干, 王军, 丁少雄, 等. 养殖大黄鱼生化组分的分析[J]. 台湾海峡, 2000, 19(2): 197-200.]
- [2] Luo Y W, Ai Q H, Mai K S, et al. Effects of dietary corn gluten meal on growth performance and protein metabolism in relation to IGF-I and TOR gene expression of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Journal of Ocean University of China, 2013, 12 (3): 418-426.
- [3] Kim J C, Hansen C F, Mullan B P, et al. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract[J]. Animal Feed Science Technology, 2012, 173(1-2): 3-16.
- [4] Dai W W, Mai K S, Xu W, et al. Effects of replacing fish meal with plant-based protein on growth, physiological and biological indices, and intestinal histology in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Güntuer[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 125-137. [代伟伟, 麦康森, 徐玮, 等. 复合植物蛋白源替代鱼粉对半滑舌鲷生长、生理生化指标和肠组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 125-137.]
- [5] Murray H M, Lall S P, Rajaselvam R, et al. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. L[J]. Aquaculture, 2010, 298(3-4): 282-293.
- [6] De S P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture[J]. The ISME Journal, 2014, 8(12): 2360-2368.
- [7] Zhou J M, Wu Z X, Zeng L B, et al. Microflora in digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(5): 613-617. [周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 613-617.]
- [8] 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. [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.]
- [9] Qin N, Li D F, Yang R F. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(4): 445-457. [秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457.]
- [10] Zhang M L, Sun Y H, Chen K, et al. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources[J]. Aquaculture, 2014, 434: 449-455.
- [11] Zhi T R. The effects of dietary supplement of probiotics on the disease-resistance and intestinal microbial composition of *Litopenaeus vannamei*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [职通瑞. 饲料中补充有益菌对凡纳滨对虾抗病力及其肠道微生物组成影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [12] Zhang Z, Li B, Wang Y G, et al. The microflora structure in digestive tract of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) cultured in outdoor pond basing on high-through sequencing technique[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 38-45. [张正, 李彬, 王印庚, 等. 基于高通量测序的池塘养殖半滑舌鲷消化道菌群的结构特征分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 38-45.]
- [13] Feng J, Wang P, He J J, et al. Effect of replacing fish meal with soybean protein concentrate on growth, body composition, serum biochemical indices, and liver histology of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 268-277. [冯建, 王萍, 何娇娇, 等. 大豆浓缩蛋白替代鱼粉对大黄鱼幼鱼生长、体成分、血清生化指标及肝组织学的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 268-277.]
- [14] Ai Q H, Xie X J. Advance in utilization of plant proteins by aquatic animals[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 36(6): 929-935. [艾庆辉, 谢小军. 水生动物对植物蛋白源利用的研究进展[J]. 中国海洋大学学报学报, 2005, 36(6): 929-935.]
- [15] Chen R, Hua X M, Huang X X, et al. Effects of replacement of fish meal by corn gluten meal in diets on growth, protease activities and apparent digestibilities of allogynogenetic silver crucian carp[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2009, 27(4): 358-367. [陈然, 华雪铭,

- 黄旭雄, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对异育银鲫生长、蛋白酶活性及表观消化率的影响[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 27(4): 358-367.]
- [16] Liu X W, Mai K S, Ai Q H, et al. Replacement of fish meal by corn gluten meal in diets of *Scophthatmus maximus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(34): 466-472. [刘兴旺, 麦康森, 艾庆辉, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对大菱鲂摄食、生长及体组成的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(34): 466-472.]
- [17] Regost C, Arzel J, Kaushik S J. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*)[J]. Aquaculture, 1999, 180(1-2): 99-117.
- [18] Zhang J L, Yu P, Huang J Q, et al. Effects of fish meal replacement by defatted silkworm pupae on growth performance body composition and health status of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(7): 1568-1578. [张建禄, 余平, 黄吉芹, 等. 脱脂蚕蛹替代饲料中鱼粉对建鲤生长性能、体成分及健康状况的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7): 1568-1578.]
- [19] Wu L F, Qin G X, Sun Z W, et al. Effect of dietary dehulled soybean meal replacing fish meal on the activity of digestive enzyme and the intestinal tissue of *Clarias lazera*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2010, 49(4): 99-105. [吴莉芳, 秦贵信, 孙泽威, 等. 饲料中去皮豆粕替代鱼粉对埃及胡子鲇消化酶活力和肠道组织的影响[J]. 中山大学学报, 2010, 49(4): 99-105.]
- [20] Xing X P. Effects of soybean meal on the growth, intestinal tissue and non-specific immunity of *Perca flavescens*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015. [邢秀苹. 豆粕对黄金鲈生长、肠道组织及非特异性免疫的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.]
- [21] Wattanaphansak S, Asawakarn T, Gebhart C J, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2008, 20(2): 170-177.
- [22] Wang B W, Wang J, Ge W H, et al. Effects of vitamin B₁ on nutrient digestibility, intestinal morphology and microbial flora of geese aged from 5 to 15 weeks[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(6): 1444-1452. [王宝维, 王姣, 葛文华, 等. 维生素 B₁ 对 5~15 周龄鹅营养物质利用率、肠道形态及微生物菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(6): 1444-1452.]
- [23] Lin J J. Effects of replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets on growth, immunity and intestinal tissue of *Carassius auratus*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [林佳洁. 发酵豆粕替代鱼粉对黄金鲫生长、免疫及肠道组织的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [24] Lu Y Y, Chang Q, Chen S Q, et al. The effects of dietary fermented soybean meal on the growth and digestive ability of spotted halibut, *Verasper variegatus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(1): 10-18. [吕云云, 常青, 陈四清, 等. 发酵豆粕对圆斑星鲈生长及消化能力的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(1): 10-18.]
- [25] Refstie S, Storebakken T, Baeverfjord G, et al. Long-term protein and lipid growth of atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level[J]. Aquaculture, 2001, 193(1-2): 91-106.
- [26] Hua X M, Wang J, Liu X G, et al. Effect of replacement of fish meal by corn gluten meal on growth and thyroid hormone contents in serum of *Carassius auratus gibelio*[J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences, 2012, 38(4): 497-503. [华雪铭, 王军, 刘兴国, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对异育银鲫生长和甲状腺激素水平的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 38(4): 497-503.]
- [27] Wei B D, Miao G W, Qiu Y L, et al. Effects of fermented corn gluten meal on growth performance, intestinal microflora number and antioxidant capacity of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(3): 952-960. [魏炳栋, 苗国伟, 邱玉朗, 等. 发酵玉米蛋白粉对肉仔鸡生长性能、肠道微生物数量和抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(3): 952-960.]
- [28] Zhang R B, Cao J M, Huang Y H, et al. Effect of dietary xylooligosaccharides on intestinal histology and microflora of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(2): 233-240. [张荣斌, 曹俊明, 黄燕华, 等. 低聚木糖对奥尼罗非鱼肠道形态、菌群组成和抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 233-240.]
- [29] Wu S G, Wang G T, Angert E R, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e30440.
- [30] Pranter C, Scribano M L, Falasco G, et al. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*[J]. Gut, 2002, 51(3): 405-409.
- [31] Xia J H, Grace L, Fu G H, et al. The intestinal microbiome of fish under starvation[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 266.
- [32] Wu S G, Tian J Y, Gatesoupe F J, et al. Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(9): 1585-1595.
- [33] Zhao H X. Study on the diversity and function of intestinal bacterial flora from different wild animals[D]. Changchun:

- Jilin Agricultural University, 2015. [赵晗旭. 不同野生动物肠道微生物多样性分析及功能初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.]
- [34] Pond M J, Stone D M, A loberman D J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2006, 261(1): 194-203.
- [35] 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.
- [36] Gu L. The effect of different diet on intestinal flora composition in different rat species[D]. Changsha: Central South University, 2014. [谷莉. 不同鼠种的肠道菌群在不同饮食结构干预中的组成改变[D]. 长沙: 中南大学, 2014.]
- [37] Wang W W, He C, Li M L, et al. Effect of different artificial diets on intestinal microbial community of *Dastarcus helophoroides*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2013, 22(5): 174-178. [王伟伟, 何彩, 李孟楼, 等. 不同人工饲料对花绒寄甲成虫肠道微生物群落组成的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(5): 174-178.]

Effects of replacing fish meal with corn gluten meal on growth, intestinal histology, and intestinal microbiota of large yellow croaker, *Larimichthys crocea*

HE Jiaojiao, WANG Ping, FENG Jian, LOU Yudong

National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: This study investigated the effects of the partial substitution of dietary fish meal by corn-gluten meal on the growth, intestinal histology, and structure of intestinal bacteria in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) (mean initial weight 10.49 g $\pm$ 0.03 g). Six isonitrogenous (45% crude protein) and isolipidic (10% crude lipid) diets with various dietary protein levels (0%, 15%, 30%, 45%, 60%, and 75%, designated as FM, CGM15, CGM30, CGM45, CGM60, and CGM75, respectively) were formulated and fed to triplicate groups for 56 d. The results showed that the survival rate (SR), specific growth rate (SGR), and feed conversion ratio (FCR) were not significantly affected ($P>0.05$). The observed intestinal histology (mucosa thickness, mucosal fold height, and goblet cell quantity) was not significantly affected in all of the groups ($P>0.05$), but some epithelial cells in the CGM60 group were destroyed or rearranged in a disorderly manner and parts of the striated border and intestinal villus were destroyed, the mucosal fold height in the CGM75 group was lower than that in the other groups, and the density and numbers of mucosal folds decreased. An Illumina MiSeq high-throughput sequencing analysis of intestinal contents showed that the Chao1, Shannon, and Simpson indices, and Good's coverage in FM, CGM15, and CGM75 were not significantly affected ($P>0.05$). The Firmicutes and Proteobacteria groups completely dominated the bacterial communities in juvenile *L. crocea*. The *Paenibacillus*, *Alkaliphilus*, *Bacillus*, and *Enterococcus* genera were the most dominant bacteria in the microbial ecosystem. At the genus level, compared to the control group, the abundances of *Streptococcus* in CGM15 and CGM75 were significantly higher ($P<0.05$), the abundances of *Devosia* and *Cellvibrio* in CGM15 were significantly lower ($P<0.05$), and the abundance of *Staphylococcus* in CGM75 was significantly higher ($P<0.05$). These results suggest that the optimal dietary-protein level is about 45% without adverse effects on growth, intestinal histology, and structure of intestinal dominant bacteria in juvenile *L. crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; corn gluten meal; growth; intestinal histology; high-throughput sequencing; intestinal microbiota

Corresponding author: WANG Ping. E-mail: 17855848289@163.com