

饲料中添加不同水平的鸡肠粉对鲤肠道菌群结构的影响

彭祖想¹, 严林¹, 卫力博¹, 高欣¹, 王悦晗¹, 翟浩杰¹, 任同军¹, 王伟^{1,2}, 韩雨哲^{1,2*}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023; 2. 大连海洋大学辽宁省北方鱼类应用生物学与增养殖重点实验室, 辽宁大连 116023)

摘要 为研究饲料中添加新型蛋白源鸡肠粉对鲤(*Cyprinus carpio*)肠道菌群的影响, 选取初始体重为(57.30±0.10)g的鲤150尾, 随机分为5组, 每组10尾鱼, 分别投喂鸡肠粉添加量为0%(D1组)、5%(D2组)、10%(D3组)、15%(D4组)、100%(D5组)的试验饲料, 进行56d养殖试验。饲养结束后, 采集肠道样品, 基于Illumina Miseq PE300平台进行高通量测序。结果表明, 饲料中添加10%和15%的鸡肠粉降低了鲤肠道菌群的多样性, 但具有改善肠道菌群结构的效果。D3、D4组 α 多样性显著低于D1组($P<0.05$)。D3组降低了变形菌门(Proteobacteria)和邻单胞菌属(*Plesiomonas*)相对丰度, D3、D4组鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)相对丰度升高。表明在鸡肠粉添加量为10%时, 鲤肠道致病菌相对丰度最低, 有益菌相对丰度最高, 对鲤肠道菌群结构有最好的改善作用。

关键词 鸡肠粉; 鲤; 高通量测序; 肠道菌群

中图分类号 S963 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)01-0085-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.01.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Different Levels Chicken Intestine Meal Supplementation on the Community Structure of Intestinal Microflora of *Cyprinus carpio*

PENG Zu-xiang, YAN Lin, WEI Li-bo et al (College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract A 56 d feeding trial was conducted to evaluate the effects of chicken intestine meal on intestinal microbiota of *Cyprinus carpio*. A total of 150 *Cyprinus carpio* with an initial body weight of (57.30±0.10) g were randomly divided into 5 groups with 3 replicates per group and allocated 10 fish in each replicate. The fish were fed experimental diets supplemented with 0% (group D1), 5% (group D2), 10% (group D3), 15% (group D4) and 100% (group D5) chicken intestine meal. After rearing, intestinal samples were collected and high-throughput sequencing was performed based on the Illumina Miseq PE300 platform. The results showed that the addition of 10% and 15% chicken intestinal meal to the feed reduced the diversity of the carp intestinal flora, but had the effect of improving the structure of the intestinal flora. The alpha diversity of the D3 and D4 groups was significantly lower than that of the D1 group ($P<0.05$). The relative abundance of *Proteobacteria* and *Pleomorphomonas* was reduced in the D3 group and increased in the D3 and D4 groups for *Cetobacterium* and *Aeromonas*. The study showed that at 10% chicken intestinal meal addition, the carp intestinal pathogenic bacteria abundance was relatively lowest and the relative abundance of beneficial bacteria was highest, which had the best effect on improving the carp intestinal flora structure.

Key words Chicken intestine meal; *Cyprinus carpio*; High-throughput sequencing; Bacterial community

近年来由于鱼粉资源的匮乏和高昂的价格导致鱼粉资源的不稳定性, 限制了水产养殖行业的可持续发展。当今迫切需要开发一种蛋白含量高、价格低廉、易获得且供应稳定的新型饲料蛋白源以满足水产饲料行业的需求。鸡肠粉是家禽副产品粉(poultry by-product meal, PBM)的一种, 是以新鲜鸡肠为原料, 经冲洗、蒸煮、喷雾干燥和粉碎等工序加工而成的新型优质饲料蛋白源。优质的鸡肠粉粗蛋白和粗脂肪含量与鱼粉接近, 部分必需氨基酸含量甚至高于鱼粉, 从营养成分及氨基酸组成分析, 鸡肠粉是一种较有潜力的优质动物蛋白^[1]。目前国内对鸡肠粉的研究较少, 笔者所在实验室前期的研究表明, 鸡肠粉能够完全替代鲤饲料中的鱼粉, 不会对鲤生长、消化和免疫等指标造成负面影响, 但并未对肠道菌群结构的影响进行深入研究^[2]。鲤(*Cyprinus carpio*)属于杂食性鱼类, 是我国重要的淡水经济养殖品种, 在水产养殖中占有很大比重。据统计, 2020年我国鲤养殖产量达289.67万t, 较2019年增加1.14万t, 增幅0.92%^[3]。作为大宗淡水鱼, 鲤饲料对鱼粉的需求巨大, 该研究以鲤为研究

对象, 探究鸡肠粉对鲤肠道菌群的影响, 以期减少淡水鱼养殖产业对鱼粉的依赖, 促进水产养殖行业的可持续发展。

鱼类肠道内存在数量巨大的微生物菌群, 菌群之间相互制约、相互平衡, 构成了一个稳定的生态系统^[4]。肠道菌群对于维持肠道健康、促进消化吸收、抑制病原菌、增强免疫应答及促进生长发育方面有重要作用^[5]。研究表明, 鱼类肠道内细菌的组成和分布由营养需求所决定^[6], 且菌群结构很大程度上取决于饵料成分^[7]。郁二蒙等^[8]使用冰鲜杂鱼和人工配合饲料饲喂大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 发现投喂冰鲜杂鱼的大口黑鲈与投喂人工配合饲料的大口黑鲈肠道菌群相似性较低, 冰鲜杂鱼组肠道菌群丰富度高于人工配合饲料组。王亚如^[9]研究发现, 高水平的豆粕替代鱼粉会很大程度改变花鲈(*Lateolabrax japonicus*)前肠肠壁优势菌群数量组成, 导致有益菌(芽孢杆菌)数量降低。殷彬^[10]研究表明, 当饲料中浓缩棉籽蛋白替代鱼粉比例达60%时, 珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂)前中肠菌群丰度失调, 不再存在优势菌。钟雷等^[11]研究发现, 随着饲料中脱脂蚕蛹替代鱼粉比例的增加, 建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)肠道菌群多样性和益生菌属数量均呈下降趋势。耿彬等^[12]研究发现, 饲料中添加不同水平的玉米干酒糟及其可溶物能够提高斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)肠道有益菌(鲸杆菌属)丰度, 降低有害菌(乳球菌属)丰度。笔

基金项目 辽宁省教育厅青年科技人才“育苗”项目(QL202004); 大连海洋大学“蔚蓝英才”人才计划项目。**作者简介** 彭祖想(1997—), 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物营养与饲料科学。*通信作者, 副教授, 博士, 从事水产动物营养与饲料科学研究。**收稿日期** 2022-01-12

者基于鲤营养研究基础,探究饲料中添加不同水平的鸡肠粉对鲤肠道菌群结构的影响,分析肠道菌群的组成,以期为鲤健康养殖以及饲料中合理使用鸡肠粉提供理论参考。

1 材料与方

1.1 试验设计和管理 试验所用鲤幼鱼购自辽宁省丹东市某养殖场,在4.3 m×1.5 m×1.2 m的水泥池中暂养14 d以熟悉试验环境,期间投喂对照组饲料。养殖试验在大连海洋大学辽宁省北方鱼类生物学及增养殖重点实验室循环水池(4.3 m×3.0 m×1.4 m)进行,采用网箱进行养殖。选取初始体重为(57.30±0.10) g的鲤150尾随机分为5组,每组3个重复,每个重复10尾,置于15个1.3 m×0.8 m×0.7 m的聚乙烯网箱中。养殖周期为56 d,每日投喂2次(09:00和17:00)表观饱食,每日吸底1次、换水1次,换水量约为1/5。

试验水体为曝气24 h以上的自来水,试验期间光照为自然光照,水体温度为(27.0±1.0)℃,溶氧为(7.0±0.5) mg/L, pH为(7.6±0.5)。

1.2 试验饲料 鸡肠粉由辽宁省鞍山裕丰饲料有限公司提供,粗蛋白65.47%,粗脂肪14.80%,其他试验饲料原料均购自于大连当地市场。试验饲料配方见表1,以鸡肠粉、鱼粉、豆粕等为主要蛋白源,以豆油为主要脂肪源配制4组等氮等脂的饲料和1组负对照组(鸡肠粉含量为100%)的饲料,标记为D1、D2、D3、D4、D5。添加量分别为0(D1组)、5%(D2组)、10%(D3组)、15%(D4组)、100%(D5组)。饲料原料过60目筛,混合均匀后经制粒机制成2 mm的颗粒饲料,放入42℃烘箱中,烘干至水分含量为10%,放入自封袋中于-20℃冰箱中保存。

表1 试验饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Ingredients and nutrient levels of experimental diets(dry matter basis)

单位:%

组别 Groups	鸡肠粉 Chicken sausage powder	鱼粉 Fish meal	玉米 蛋白粉 Corn gluten meal	豆粕 Soybean meal	菜粕 Rapeseed meal	小麦粉 Wheat meal	豆油 Soybean oil	微晶 纤维素 Microcry- stalline cellulose	氯化钠 Sodium chloride	磷酸 二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	氯化胆碱 (50%) Choline chloride	维生素C Vitamin C	维生素 预混料 Vitamin premix	矿物质 预混料 Mineral premix
D1	0	4	5	38.5	6	36.31	4.1	3	0.3	2	0.15	0.04	0.1	0.5
D2	5	4	5	36.5	6	30.91	3.5	6	0.3	2	0.15	0.04	0.1	0.5
D3	10	4	5	34.5	6	25.51	2.9	9	0.3	2	0.15	0.04	0.1	0.5
D4	15	4	5	32.5	6	20.11	2.3	12	0.3	2	0.15	0.04	0.1	0.5
D5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

组别 Groups	营养水平 Nutritional level			
	水分 Water content	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	粗灰分 Coarse ash
D1	10.03	31.23	5.49	6.67
D2	10.08	31.48	5.61	6.68
D3	10.15	31.73	5.72	6.70
D4	10.17	31.98	5.84	6.99
D5	10.09	65.47	14.80	6.12

注:维生素预混料和矿物质预混料参照石立冬等^[13]。

Note: Vitamin premix and mineral premix refer to Shi Lidong et al^[13].

1.3 样品采集 试验结束后,试验鱼停食24 h,使用50 mg/L的MS-222溶液麻醉。从每个网箱中随机取3条鱼,使用无菌剪刀于冰上进行解剖,取带有内容物的前中肠置于无菌5 mL离心管中,-80℃冷冻保存,用于总DNA提取。

1.4 总DNA提取、PCR扩增及高通量测序 取鲤的前中肠样本按照OMEGA E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit(Omega,美国)试剂盒说明书进行总DNA提取,使用Qubit® 3.0 Q32866荧光计检测DNA浓度和纯度,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。总DNA根据16S rRNA基因V3-V4引物:341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3');805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')在ETC811型PCR仪上进行PCR扩增。利用Illumina Miseq PE300平台(上海生工生物技术有限公司)进行高通量测序。

1.5 数据处理 采用Cutadapt、Pear、Prinseq软件处理原始数据,原始测序序列使用Trimmomatic软件质控,使用FLASH软件进行拼接,利用UPARSE软件,根据97%的相似度对序

列进行OTU聚类。最后利用RDP对每条序列进行物种分类注释,后续多样性分析均在上海生工生物技术有限公司分析平台进行。

2 结果与分析

2.1 样本测序分析 经测序,5组样品共获得高质量序列900 235条,其中每个样本产生的有效序列为46 782~68 774条,平均长度为423 bp。由图1可知,稀释曲线逐渐趋于平缓,表明数据样本够大,测试深度足够覆盖样品菌群的多样性,测试结果合理可信。

由图2可知,5组鲤肠道菌群高通量测序后共获得890个OTU,D1、D2、D3、D4、D5组分别包含623、491、501、502、577个OTU,5组共有的OTU数为230个,每组特有的OTU数表现为D2组(73)>D3组(67)>D1组(64)>D5组(39)>D4组(13)。D2组特有的OTU数量最多,占总OTU的8.20%。

2.2 肠道微生物α多样性分析 由表2可知,D1组OTUs数显著高于D3组($P<0.05$),与其他组差异不显著($P>$

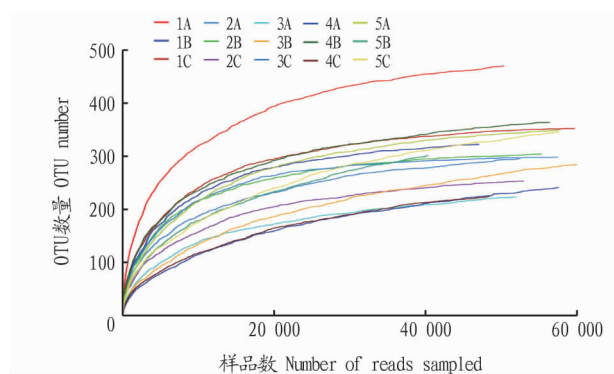


图1 样本稀释曲线

Fig. 1 Sample dilution curve

0.05)。每组样本的平均 OTUs 数为 268~382,覆盖率均大于 99%。D1 组 Chao 指数和物种丰富度指数高于其他各组 ($P > 0.05$)。D1 组 Shannon 指数显著高于 D4 组 ($P < 0.05$),与其他组差异不显著 ($P > 0.05$)。D1 组 Simpson 指数显著低于 D4 组 ($P < 0.05$),与其他组差异不显著 ($P > 0.05$)。表明 D1 组鲤肠道菌群丰富度和均匀度显著高于 D4 组 ($P < 0.05$),D1 组鲤肠道菌群相对丰度更高,鲤肠道菌群丰富度随鸡肠粉添加量的增加呈先下降后上升的趋势。

表2 鲤肠道菌群 α 多样性分析Table 2 Alpha diversity analysis of the intestinal flora of *Cyprinus carpio*

组别 Groups	OTU 数 OTUs	Chao 指数 Chao index	Shannon 指数 Shannon index	Ace 指数 Ace index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖率 Good's coverage
D1	381.33±45.17 b	409.53±54.02 a	3.10±0.21 b	409.16±54.94 a	0.11±0.01 a	0.999 0±0.000 3 a
D2	284.00±15.72 ab	310.30±13.63 a	2.68±0.03 ab	305.00±15.97 a	0.12±0.00 a	0.999 0±0.000 2 a
D3	268.67±23.14 a	335.68±49.63 a	2.23±0.35 ab	351.49±70.35 a	0.22±0.06 ab	0.999 0±0.000 4 a
D4	276.33±44.11 ab	346.67±36.20 a	1.92±0.43 a	345.83±31.06 a	0.29±0.07 b	0.998 0±0.000 1 a
D5	331.67±15.38 ab	398.42±10.40 a	2.57±0.05 ab	398.67±11.65 a	0.15±0.01 ab	0.999 0±0.000 5 a

注:同列不同小写字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference between different groups ($P < 0.05$).

2.3 肠道菌群结构的组成 各组鲤肠道菌群在门水平相对丰度见图 3。在门水平上,各组优势菌群均为变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),其中变形菌门在各组中占绝对优势,相对丰度分别为(63.27±7.33)%、(71.51±4.12)%、(53.72±8.84)%、(65.77±2.79)%、(68.92±8.94)%。D1、D2 组第二优势菌群为拟杆菌门,相对丰度分别为(16.25±2.60)%、(15.88±1.52)%;D3、D4 组第二优势菌群为梭杆菌门,相对丰度分别为(31.00±15.41)%、(21.97±9.93)%;D5 组第二优势菌群为梭杆菌门,相对丰度为(12.61±8.56)%、与第三优势种群拟杆菌门的相对丰度(12.45±3.09)%相近。

各组鲤肠道菌群在属水平的相对丰度见图 4。在属水平上,各组优势菌群均为邻单孢菌属(*Pleomorphomonas*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、寡养单孢菌属(*Stenotrophomonas*)、气单孢菌属(*Aeromonas*)、戴尔福特菌属(*Delfia*)。D1 组第一优势菌群为邻单孢菌属,相对丰度为(18.79±

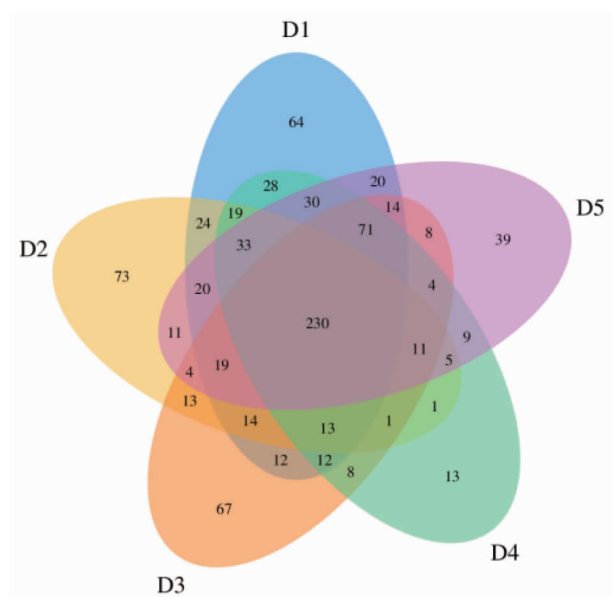


图2 饲料中添加鸡肠粉对鲤肠道菌群组成影响的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the effect of chicken intestinal meal addition to feed on the composition of the intestinal flora of *Cyprinus carpio*

3.57)% ,优势菌群的相对丰度表现为邻单孢菌属>不动杆菌属>鞘氨醇杆菌属>寡养单孢菌属>戴尔福特菌属>鲸杆菌属>气单孢菌属。D2 组第一优势菌群为不动杆菌属,相对丰度为(22.36±3.31)% ,优势菌群表现为不动杆菌属>鞘氨醇杆菌属>邻单孢菌属>戴尔福特菌属>寡养单孢菌属>鲸杆菌属>气单孢菌属。D3 组第一优势菌群为鲸杆菌属,相对丰度为(31.00±15.41)% ,优势菌群的相对丰度表现为鲸杆菌属>邻单孢菌属>不动杆菌属>气单孢菌属>鞘氨醇杆菌属>寡养单孢菌属>戴尔福特菌属。D4 组第一优势菌群为邻单孢菌属,相对丰度为(36.18±14.20)% ,优势菌群的相对丰度表现为邻单孢菌属>鲸杆菌属>不动杆菌属>鞘氨醇杆菌属>气单孢菌属>寡养单孢菌属>戴尔福特菌属。D5 组绝对优势菌群为邻单孢菌属,相对丰度为(19.53±8.99)% ,优势菌群表现为邻单孢菌属>不动杆菌属>鲸杆菌属>鞘氨醇杆菌属>气单孢菌属>寡养单孢菌属>戴尔福特菌属。

2.4 肠道微生物 β 多样性分析 β 多样性分析主要用于比较样本之间菌群结构是否相似。非度量多维度分析(NMDS)

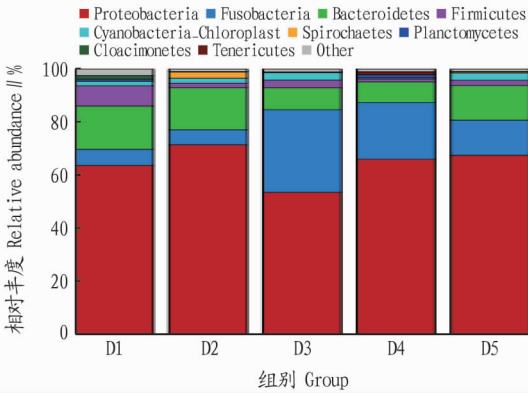


图 3 鲤肠道菌群在门水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of intestinal flora of *Cyprinus carpio* at phylum level

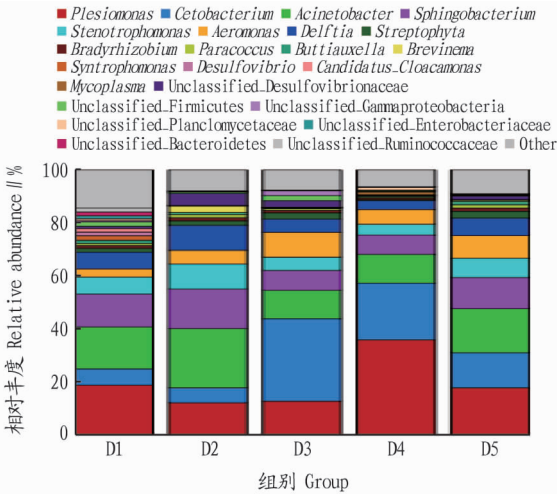


图 4 鲤肠道菌群在属水平组成相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of intestinal flora of *Cyprinus carpio* at genus level

是一种常用的 β 多样性分析方法。图形中的点代表样本,点与点之间的距离可以反映出样本差异程度,距离越近相似度

越高。同一圆圈内的点代表样本之间无明显差异,没有交汇圆圈内的点代表样本之间有明显差异。由图 5 可知,D1 组与 D2、D3、D4 组没有交集,D3 组与 D4 组两者之间也没有交集,说明 D1 组与 D2、D3、D4 组,D3 组和 D4 组肠道微生物的组成有明显差异,表明饲料中添加不同水平的鸡肠粉后,鲤肠道微生物组成有明显差异。D1 组与 D5 组两者之间有交集,表明当饲料中鸡肠粉添加量为 100%时,鲤肠道微生物组成与添加量为 0 时无明显差异。

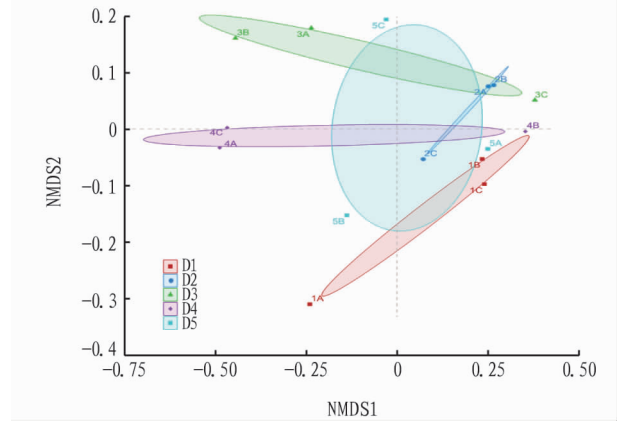


图 5 鲤肠道菌群的 β 多样性分析

Fig. 5 β -diversity analysis of intestinal flora of *Cyprinus carpio*

2.5 肠道菌群结构差异分析 使用 LEfSe 分析鲤肠道样本具有显著丰度差异特征的菌群,D1 组和 D2 组在属水平菌群差异见图 6 和图 7。由在属水平上 LEfSe 分析的结果可知,D1 组显著丰度差异特征菌为紫单孢菌属 (*Porphyromonas*),D2 组为螺旋体属 (*Brevinema*)。图 7 中,在纲 (Class) 至属水平上,D1 组和 D2 组菌群丰度差异显著,D1 组主要富集拟杆菌纲 (Bacteroidia)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、紫单孢菌科 (Porphyromonadaceae)、紫单孢菌属 (*Porphyromonas*);D2 组主要富集螺旋体纲 (Spirochaetia)、螺旋体目 (Spirochaetales)、螺旋体科 (Brevinemataceae)、螺旋体属 (*Brevinema*)。

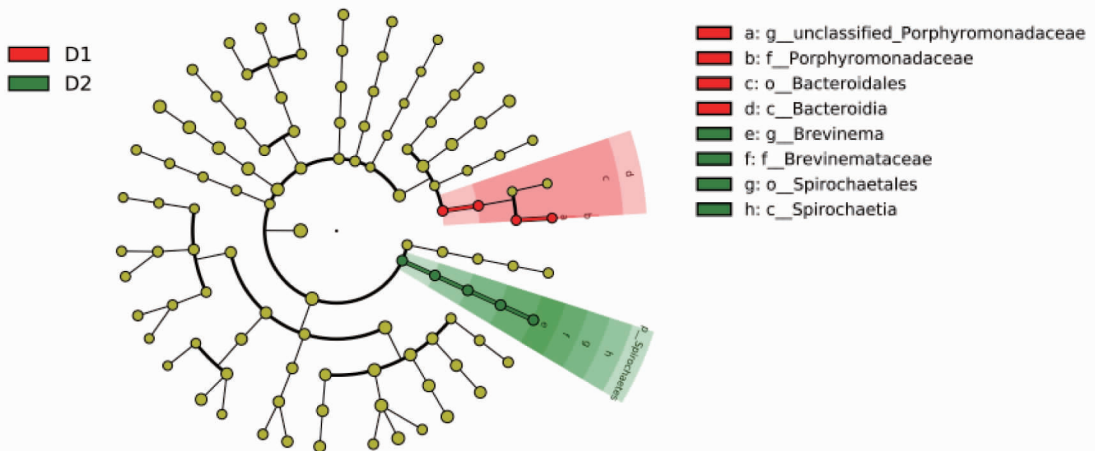


图 6 LEfSe 多级物种层级树

Fig. 6 LEfSe multi-level species hierarchy tree diagram

3 讨论

健康的鱼类肠道中定殖大量的微生物,菌群之间相互平

衡形成了稳定的生态系统,维持着机体内环境的稳定。正常的菌群在维持肠道健康、促进营养物质的消化吸收、抑制病

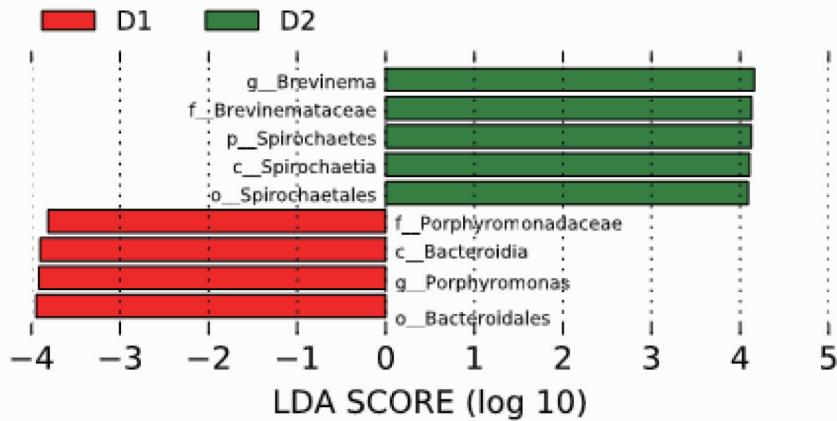


图7 LDA 判别柱形图

Fig.7 LDA discriminant bar chart

原菌侵入、机体免疫及鱼体生长发育过程中起着重要作用^[14-15]。因此研究鱼类肠道菌群的变化对于鱼类的健康养殖有重要意义。 α 多样性可以反映肠道菌群的丰富度和均匀度,Chao指数、Ace指数、Shannon指数越大,Simpson指数越小,说明肠道菌群的物种多样性和均匀度越高^[16-17]。 β 多样性分析主要用于比较样本之间菌群结构是否相似,在该试验中使用非度量多维度分析比较各组鲤肠道菌群的相似性,发现D1组与D2、D3、D4组,D3组和D4组肠道微生物的组成差异显著($P < 0.05$),表明饲料中添加鸡肠粉对鲤肠道微生物组成有显著影响。在该研究中,D1组Shannon指数显著高于D4组,D1组Simpson指数显著低于D4组,说明D1组鲤肠道菌群丰富度和均匀度显著高于D4组。D1组OTU数显著高于D3组,与其他组差异不显著,表明D1组肠道菌群的相对丰度显著高于D3组。表明饲料中添加10%和15%的鸡肠粉能够降低鲤肠道微生物多样性,结合门水平和属水平分析结果,鲤肠道微生物多样性的降低很有可能是由于添加10%和15%的鸡肠粉促进了有益菌群的繁殖,抑制条件致病菌的滋生,从而降低了D3、D4组肠道菌群的多样性。研究发现鱼类肠道微生物多样性会受到饲料成分的影响^[18-19],钟雷等^[11]研究表明,饲料中脱脂蚕蛹添加量的增加会导致鲤肠道菌群多样性和益生菌属数量下降。Yang等^[20]发现投喂不同日粮的鲤肠道菌群的多样性和丰度差异显著,投喂浮萍组的鲤肠道拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度显著高于投喂蚯蚓组。Zarkasi等^[21]研究表明,饲料成分对大西洋鲑鱼(*Salmo salar* L.)肠道微生物多样性影响显著,肠道菌群多样性的改变也与饮食代谢相关。

研究表明,鲤肠道菌群主要由变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌门、厚壁菌门构成,这些细菌在鱼类营养和机体健康方面有重要作用^[22]。在该研究中,饲喂不同添加水平鸡肠粉各组鲤肠道主要菌群在门水平上主要由变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌门、厚壁菌门构成,这与一些对鲤肠道微生物群落研究结果相一致^[23-24],但各组优势菌群的相对丰度有所差异。变形菌门是水产动物肠道菌群的优势种群之一,但相对丰度过高可能存在水产动物潜在的致病风险^[25]。在该研究中,各组鲤肠道变形菌门的相对丰度均无显著差异,但D3组

变形菌门的相对丰度低于其他各组,表明饲料中添加10%的鸡肠粉能够在一定程度上降低鲤养殖过程中的致病风险。研究发现,大多数益生菌来自拟杆菌门和厚壁菌门,且拟杆菌和厚壁菌也被证实能够改善鱼类消化和免疫状态^[26-27]。梭杆菌门被证实可以分泌丁酸盐和合成维生素,改善鱼类健康^[28]。在该试验中,D1组拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度均高于其他各组,分别为(16.25±2.60)%和(7.73±4.20)%,D4组拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度均低于其他各组,分别为(7.46±6.38)%和(1.17±0.25)%。但D3组和D4组梭杆菌门相对丰度分别为(31.00±15.41)%和(21.97±9.93)%,D1组梭杆菌门相对丰度仅为(6.35±3.37)%,相较于D1组,D3、D4组梭杆菌门的相对丰度有很大幅度升高。以上结果很可能是由于饲料中添加10%和15%的鸡肠粉后,促进了鲤肠道有益菌繁殖,改变了有益菌群的相对丰度。

使用LEfSe分析鲤肠道样本具有显著丰度差异特征的菌群,结果发现,D1组显著丰度差异特征菌为紫单孢菌属,D2组为螺旋体属,说明饲料中添加5%的鸡肠粉影响了鲤肠道菌群结构。在属水平上,鲤肠道菌群主要由邻单孢菌属、鲸杆菌属、不动杆菌属、鞘氨醇菌属、寡养单孢菌属、气单孢菌属、戴尔福特菌属构成。研究表明,邻单孢菌属包含许多条件致病菌,能够引起鱼类腹泻^[24,29]。各组间邻单孢菌属相对丰度差异不显著,但D2、D3组邻单孢菌属相对丰度较D1组有所降低,说明饲料中添加10%和15%的鸡肠粉能够在一定程度上降低条件致病菌属的相对丰度,降低患病的可能。值得注意的是,D4组邻单孢菌属相对丰度为(36.18±14.20)%,是D1组相对丰度(18.79±3.57)%的1.93倍,条件致病菌丰度有较大幅度的升高。与此同时,D4组鲸杆菌属相对丰度也有较大幅度增加,由D1组的(6.34±3.37)%上升为(21.97±9.93)%,表明饲料中添加15%的鸡肠粉能够提升有益菌属的相对丰度对致病菌属起到拮抗作用。D5组邻单孢菌属的相对丰度与D1组较为接近,但D5组鲸杆菌属相对丰度为(12.61±8.56)%,是D1组的1.99倍,表明饲料中添加100%的鸡肠粉能够提高有益菌群的相对丰度。研究表明,鲸杆菌属在鲤肠道中属优势菌属,能够发酵多肽碳水化合物和产生维生素B₁₂参与鱼类的营养消化过程,也能够

一定程度上抑制病原菌的繁殖和增强机体的免疫状态^[30]。气单孢菌在正常情况下是健康鱼类肠道中的有益菌,能够抑制病原菌在肠道中的繁殖,提高机体免疫力^[31-32]。不动杆菌属被认为是有益菌,能够分泌胞外酶促进鱼类的消化和吸收^[33]。鞘氨醇菌属于强过氧化氢菌,具有很强的解毒能力^[21]。在该研究中,D3、D4、D5组鲸杆菌属的相对丰度和D2、D3、D4、D5组气单孢菌属的相对丰度较D1组都有较大幅度增加,说明饲料中添加适量的鸡肠粉能够在一定程度上提高有益菌的相对丰度。D3、D4组不动杆菌属和鞘氨醇菌属相对丰度的减少很可能是与致病菌拮抗作用的结果。

4 结论

在该研究中,饲料中添加适量的鸡肠粉会降低鲤肠道菌群的多样性,但具有改善肠道菌群结构的效果。相较于鸡肠粉添加量为0%、5%、15%和100%,添加量为10%时,鲤肠道致病菌丰度最低,有益菌相对丰度最高,且当鸡肠粉添加量为100%时,鲤肠道有益菌相对丰度也未下降。因此,在该试验条件下,饲料中添加10%的鸡肠粉对鲤肠道菌群结构有较好的改善作用。

参考文献

- [1] TABINDA A B, BUTT A. Replacement of fish meal with poultry by-product meal (chicken intestine) as a protein source in grass carp fry diet [J]. Pakistan journal of zoology, 2012, 44(5): 1373-1381.
- [2] 彭祖想, 严林, 卫力博, 等. 鸡肠粉替代鱼粉对鲤生长、消化及免疫相关理化指标的影响 [J]. 饲料工业, 2021, 42(22): 52-59.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2021 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- [4] SIVIERI K, BASSAN J, PEIXOTO G, et al. Gut microbiota and antimicrobial peptides [J]. Current opinion in food science, 2017, 13: 56-62.
- [5] DE SCHRYVER P, VADSTEIN O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture [J]. The ISME journal, 2014, 8(12): 2360-2368.
- [6] ROMERO J, RINGØ E, MERRIFIELD D L. The gut microbiota of fish [M]//MERRIFIELD D, RINGØ E. Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014: 75-100.
- [7] 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] 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] 王亚如. 豆粕替代鱼粉对花鲈生长性能和肠道健康的影响 [D]. 厦门: 集美大学, 2017.
- [10] 殷彬. 植物蛋白源替代鱼粉对珍珠龙胆生长性能、肠道菌群和免疫的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- [11] 钟雷, 吉红, 夏耘, 等. 脱脂蚕蛹替代日粮中鱼粉对建鲤肠道菌群的影响 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 531-540.
- [12] 耿彬, 陈开健, 刘祥, 等. 饲料中添加不同水平玉米干酒糟及其可溶物对斑点叉尾(鱼回)生长、体色、肉色、血清生化指标及肠道菌群结构的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(5): 2864-2874.
- [13] 石立冬, 卫力博, 翟浩杰, 等. 不同蛋白源饲料中添加限制性氨基酸对红鲫 *Carassius auratus* 生长、消化及免疫能力的影响 [J]. 水产学杂志, 2021, 34(2): 56-64.
- [14] 黄鑫玮, 杨莎莎, 刘毅, 等. 壳寡糖对幼建鲤生长性能、脂肪代谢、非特异性免疫功能和肠道健康的影响 [J]. 动物营养学报, 2015, 27(7): 2106-2114.
- [15] YUKGEHNAISH K, KUMAR P, SIVACHANDRAN P, et al. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish [J]. Reviews in aquaculture, 2020, 12(3): 1903-1927.
- [16] YIN Z, LIU Q, LIU Y, et al. Early life intervention using probiotic *Clostridium butyricum* improves intestinal development, immune response, and gut microbiota in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae [J]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 1-12.
- [17] 邢薇, 罗琳. 西伯利亚鲟和欧洲鲟肠道菌群的比较分析以及棉籽蛋白替代部分鱼粉对欧洲鲟肠道菌群的影响研究 [J]. 中国水产, 2021(10): 83-88.
- [18] 何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 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 [J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 361-372.
- [19] 何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究 [J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 919-928.
- [20] YANG S, DU J, LUO J, et al. Effects of different diets on the intestinal microbiota and immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Journal of applied microbiology, 2019, 127(5): 1327-1338.
- [21] ZARKASI K Z, TAYLOR R S, ABELL G C J, et al. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) gastrointestinal microbial community dynamics in relation to digesta properties and diet [J]. Microbial ecology, 2016, 71(3): 589-603.
- [22] VAN KESSEL M A H J, DUTILH B E, NEVELING K, et al. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. AMB express, 2011, 1: 1-9.
- [23] 胡文攀. 怀山药对鲤免疫功能及肠道微生态的效应研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2020.
- [24] 孙悦, 王广军, 张凯, 等. 稻田环境对鲤血清生化指标、肠道组织形态及细菌群落结构的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 601-612.
- [25] GAO S, PAN L Q, HUANG F, et al. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Aquaculture, 2019, 499: 109-118.
- [26] EGERTON S, CULLOTY S, WHOOLEY J, et al. The gut microbiota of marine fish [J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 1-17.
- [27] COSTANTINI L, MOLINARI R, FARINON B, et al. Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota [J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(12): 1-18.
- [28] ROESELERS G, MITTGE E K, STEPHENS W Z, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. The ISME journal, 2011, 5(10): 1595-1608.
- [29] 周金敏. 黄颡鱼肠道菌群分析和益生菌的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [30] TSUCHIYA C, SAKATA T, SUGITA H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish [J]. Letters in applied microbiology, 2008, 46(1): 43-48.
- [31] 孙中石, 范艳蕊, 吕爱军, 等. 锦鲤肠道不同部位菌群组成结构及多样性分析 [J]. 南方农业学报, 2021, 52(2): 483-490.
- [32] NAYAK S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish [J]. Aquaculture research, 2010, 41(11): 1553-1573.
- [33] RAY A K, GHOSH K, RINGØ E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review [J]. Aquaculture nutrition, 2012, 18(5): 465-492.