

不同饲养方式对乌鳢(*Ophiocephalus argus*)肠道微生物群落结构差异及种类多样性的影响*

盛鹏程¹ 周冬仁¹ 韩新荣² 胡晓波² 叶雪平¹ 徐 磊¹ 周 聃¹
吴琦芳¹ 郝贵杰^{1①}

(1. 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001;
2. 桐乡市水产工作站 桐乡 314500)

摘要 以乌鳢(*Ophiocephalus argus*)为研究对象,采用不同日粮饲喂,试验 W1 组饲喂冰鲜鱼,试验 W2 组饲喂畜禽内脏。12 周后,取肠道内容物,利用 16S rDNA 技术研究投喂不同饲料的乌鳢肠道生物群落结构差异和微生物多样性,分别获得 W1 组和 W2 组乌鳢肠道细菌有效序列 51124 和 39298 条。结果分析表明;W1 组和 W2 组物种注释(operational taxonomic unit, OTU)数目分别为 2631 和 4114 条,分类地位明确的细菌种类分别隶属 5 个属和 49 个属, W1 组和 W2 组乌鳢肠道细菌种类差异很大。W1 组乌鳢肠道细菌的优势类群是邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、鲸蜡菌属(*Cetobacterium*); W2 组乌鳢肠道细菌的优势类群是狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、*Spartobacteria*、甲基副球菌属(*Methyloparacoccus*)、杆菌属(*Alsobacter*)、*Saccharibacteria*、分支杆菌属(*Mycobacterium*)。W2 组乌鳢肠道细菌香农指数高于 W1 组乌鳢肠道细菌,表明前者肠道细菌多样性大于后者。本实验揭示了畜禽内脏饲喂乌鳢肠道细菌的群落种类多样性、OTU 丰富度和物种总数均高于冰鲜鱼饲喂乌鳢; W1 组肠道有益菌 OTU 丰富度大于 W2 组,且 W2 组还存在一些潜在致病菌。本研究为乌鳢的健康养殖和后续肠道微生物资源的挖掘提供了理论依据。

关键词 乌鳢(*Ophiocephalus argus*); Illumina MiSeq 高通量测序; 投喂方式; 肠道微生物; 群落结构
中图分类号 S965.1; Q939.9 doi: 10.11693/hyh20190800160

乌鳢(*Ophiocephalus argus*), 又名黑鱼、乌鱼、生鱼、财鱼、蛇鱼、火头鱼等, 隶属于鳢科、鳢属。除新疆、西藏外, 乌鳢在我国各大水系广泛分布。乌鳢营养丰富、骨刺少、蛋白含量高, 且具有去瘀生新、滋补调养、健脾利水的医疗功效, 是集食用与药补于一身的名贵鱼类。据不完全统计, 目前乌鳢的养殖面积 5764ha, 总产量达到 51788t, 总产值为 10.38 亿元。

微生物大量地存在于肠道中, 将其作为栖息地。肠道不仅有复杂的微生态系统, 而且其作为宿主生命活动的重要组成部分, 对宿主的生长发育也具有

重要的影响(刘增新等, 2017)。稳定的肠道微生物区系对多种宿主功能都有影响, 如肠道微生物的建立及感染敏感性等。肠道微生物对宿主免疫、宿主适应性及宿主营养代谢等宿主的生命活动有十分重要影响(Wu *et al*, 2010; Ravel *et al*, 2014)。而饲料改变会影响动物肠道微生物种类及数量(Xu *et al*, 2015)。为了更好地理解肠道微生物群与宿主之间的关系, 有必要确定肠道微生物的组成及其比例。目前, 对水产养殖动物肠道微生物多样性进行的研究很多, 如黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

* 浙江省科技计划项目, 2016C32075 号; 浙江省科技计划项目, 2017C02026 号。盛鹏程, 硕士, 工程师, E-mail: 499356345@qq.com; 同等贡献第一作者: 周冬仁, 高级工程师, E-mail: 872559718@qq.com

① 通信作者: 郝贵杰, 博士, 副研究员, E-mail: 391601350@qq.com

收稿日期: 2019-08-28, 收修改稿日期: 2019-10-13

idellus)、对黑虎虾(*P. monodon*)和太平洋蓝虾(*Litopenaeus stylirostris*) (Wu *et al.*, 2010; Rungrassamee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Cardona *et al.*, 2016), 但对乌鳢肠道微生物的研究鲜有报道。

目前不少养殖户为了降低养殖成本, 在乌鳢的养殖过程中投喂畜禽内脏, 但投喂畜禽内脏对乌鳢的影响尚未明确。本试验以乌鳢为研究对象, 将冰鲜鱼、畜禽内脏两种投喂方式应用于乌鳢的养殖, 对乌鳢消化道的微生物开展相关研究, 评价不同的养殖方式对乌鳢肠道中微生物菌群种类的影响, 为评价乌鳢的产品质量, 发展健康绿色生态养殖提供参考。为探究饲料因素对乌鳢肠道的菌群组成与宿主间特异性关系等提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 动物试验

试验场地选址于浙江省嘉兴市某渔场, 选择健康、规格基本一致的乌鳢(*Ophiocephalus argus*)随机分为试验 W1 组、W2 组。每组 2 个重复, 分别饲喂于 4 个池塘中, W1 组投喂冰鲜鱼, W2 组投喂畜禽内脏。以乌鳢体重 4% 左右投喂饲料。每日 7:00 与 17:00 各投喂 1 次, 共投喂为 12 周。

1.2 样品采集

乌鳢养殖试验结束后进行样品采集, 每组取 6 尾鱼, 无菌操作台中将其肠道迅速分离, 内容物取出并混合后, 于液氮中速冻, 最后置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.3 总 DNA 的提取

从 -80°C 超低温冰箱取出两组样品, 在无菌条件下用电动组织研磨器充分研磨, 参照粪便基因组 DNA 提取试剂盒说明步骤提取总 DNA。将提取的 DNA 取 2 μL 利用电泳仪(120V, 30min)检测, 选取具有单一条带的 DNA 作为模板, 扩增其 16S rRNA V4—V5 区, 扩增引物采用 515F 和 907R。PCR 采用 20 μL 扩增体系: 4 μL 5 $\times$ Fast Pfu Buffer, 2 μL 2.5mmol/L dNTPs, 0.4 μL 上游引物, 0.4 μL 下游引物, 0.4 μL Fast Pfu Polymerase, 10ng Template DNA, 加灭菌水补至

20 μL 。扩增条件: 95°C 预变性 2min; 25 个循环, 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 45s; 72°C 延伸 10min。

1.4 文库构建和测序

PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳验证, 目的条带胶采用 QIA quick GelEx-traction Kit 试剂盒(Qiagen, 德国)回收纯化, 将纯化产物送至上海美吉生物有限公司, 测序平台为 Illumina MiSeq。DNA 样品送至上海生工进行 Illumina Hiseq 高通量测序分析, 样品编号分别为: W1-1、W1-2; W2-1、W2-2。

1.5 生物信息学分析

首先将得到的数据进行处理, 然后进行 OTU 聚类分析, 采用 Alpha 多样性分析、衡量样本物种的多样性。对序列进行物种分类, 并对每个样本和每个物种单元分类进行序列丰度的计算, 构建样本和物种分类单元序列的丰度矩阵, 分析物种的分类。基于 OTU 聚类分析及物种分类的共有进行多维度分析。绘制所有群落分布间的进化树图, 同时绘制 OTU 聚类结果中丰度较高的 OTU 进化树图, 并标注出其所属的群落分布信息, 对所涉及的物种进行分类树构建。使用 Beta 多样性分析, 比较多(组)样本之间的差别度量。最后进行菌群差异分析和功能预测分析。

2 结果与分析

2.1 序列数与 OTU 数量统计

2.1.1 样本数据统计 高通量测序的最原始的测序序列数、经过处理和质控后得到的最终序列以及序列平均长度(表 1), 由表可知, 每个样品所得条带序列均在 15000 条以上, 共得到序列 242609 条。

去除嵌合体及非特异性扩增序列后, 得到数据见表 2。由表 2 可知, 去除嵌合体及非特异性扩增序列后 W1-1、W1-2、W2-1、W2-2 的序列数分别为 47800、54448、38546、40050。

2.1.2 基因 OTU 的 VENN 图 VENN 图用来统计样本中共有和独有 OTU 的数目, 直观展现出环境样品 OTU 数目组成的相似性及重叠情况等。优化序列在 Silva 数据库进行相似性比对, OTU 序列分类(97%相似水平)是采用 RDP classifier 贝叶斯算法进行

表 1 各样本数据信息统计
Tab.1 Statistics of sample data information

组别	样本	Barcode	原始 reads 数目	原始序列平均长度	QC 后剩余 reads 数目	QC 后序列平均长度
W1	W1-1	CTTGTA	49092	455.23	47853	415.75
W1	W1-2	GTTTCG	56582	455.83	55013	416.22
W2	W2-1	GTCGGA	40793	453.9	39833	414.88
W2	W2-2	AATATC	42362	459.86	41284	420.49

表 2 处理后结果统计表
Tab.2 Statistical results after treatment

组别	样本名	处理前序列总数	比对到细胞器组织序列数目	非靶区序列数目	嵌合体数目	处理后剩余序列
W1	W1-1	47853	7	0	46	47800
W1	W1-2	55013	11	0	554	54448
W2	W2-1	39833	758	0	529	38546
W2	W2-2	41284	1127	4	103	40050

的, W1-1 组肠道细菌获得 OTU 1072 个, W1-2 组肠道细菌获得 OTU 1559 个, W2-1 组肠道细菌获得 OTU2385 个, W2-2 组肠道细菌获得 OTU 1729 个, W1 组和 W2 组共同含有 OTU 19 个(图 1)。

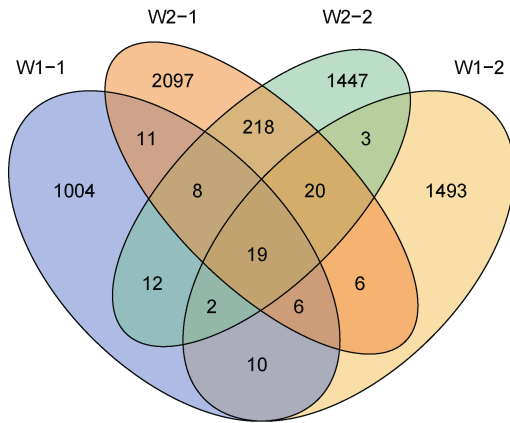


图 1 OTU 分布 Venn 图
Fig.1 Venn diagram of OTU distribution

2.1.3 基于 OTU 的样本聚类树 样本聚类树图(图 2)通过树枝结构直观反映出多个样品间的相似性和差异关系。根据 beta 多样性距离矩阵进行层次聚类(Hierarchical clustering)分析, 再使用非加权组平均法(UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean)算法进行树状结构构建, 从而获得树状关系形式进行可视化分析。

2.2 肠道菌群的 α 多样性

2.2.1 Alpha 多样性 各样品的 OTU 数目、Shannon 指数、ACE 指数、Chao1 指数及样品覆盖率

表 3 肠道微生物多样性的统计分析
Tab.3 Statistical analysis of intestinal microbial diversity

样本名称	Seq 数目	OTU 数目	Shannon 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Coverage 覆盖率	Simpson 多样性指数
W1-1	47800	1072	1.24	67267.24	28263.37	0.98	0.42
W1-2	54448	1559	1.40	253288.39	73616.56	0.97	0.39
W2-1	38546	2385	3.78	16508.72	8561.10	0.96	0.12
W2-2	40050	1729	4.18	18076.75	12253.11	0.97	0.04

2.3 乌鳢肠道菌群结构

2.3.1 PCA 分析 见图 4。不同颜色的点代表不同的样本, 若空间距离越近, 则相似度越高。从图

如表 3 所示, 由表 3 可知, 4 组样品的覆盖率均在 96% 以上, 较好地反映了样本菌群情况, W1 样品中 ACE 和 Chao1 指数最大, 说明饲喂冰鲜鱼乌鳢肠道中菌群总数最多, W2 样品中 OTU 数目最多且 Shannon 指数最高, 说明饲喂畜禽内脏乌鳢肠道中菌群丰度最高, 多样性最好。

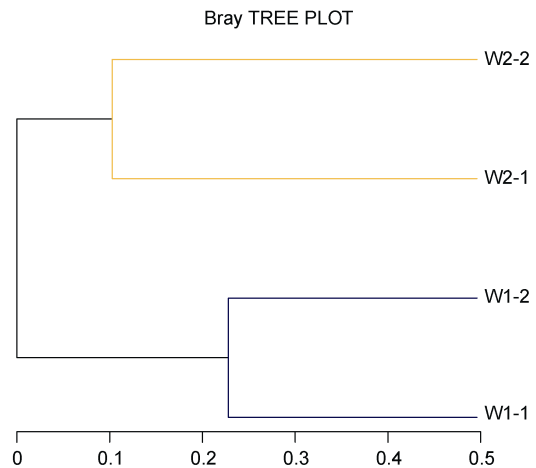


图 2 基于 OTU 样本的聚类树图
Fig.2 Bray tree plot based on OUT

2.2.2 Alpha 指数稀疏曲线 通过 MiSeq 测序平台对饲喂冰鲜鱼和畜禽内脏乌鳢肠道细菌的 16S rDNA 基因 V3—V4 区进行微生物多样性的检测分析, 获得 W1 组和 W2 组平均细菌总优化序列 51124 和 39298 条。采用 Mothur 软件绘制稀释曲线(Shannon rarefaction plot)。曲线慢慢走向平稳, 即表明测序数据量合理可靠(图 3)。

4 中均可以看出, W1 冰鲜鱼饲喂乌鳢肠道中菌群差异比较小, W2 饲喂畜禽内脏乌鳢肠道中菌群相似度较高。

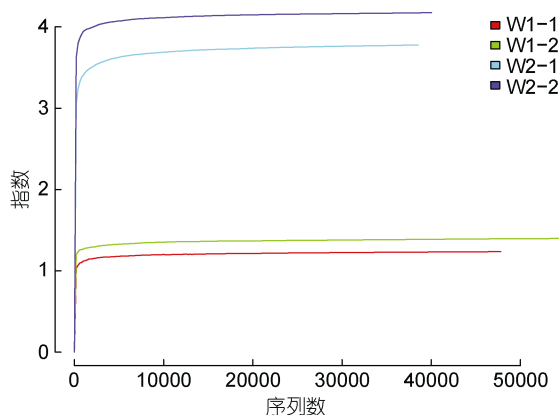


图3 Alpha 指数稀疏曲线图

Fig.3 Alpha exponential sparse curve

2.3.2 样本间菌群丰度差异分析 样本间菌群丰度差异分析(图5)显示, W1 组饲喂冰鲜鱼乌鳢肠道中未分类菌群丰度较小, W2 组畜禽内脏饲喂乌鳢肠道中未分类菌群丰度较大; W1 组畜禽内脏饲喂乌鳢肠

道中邻单胞菌属(*Plesiomonas*)占极大比例, W2 组邻单胞菌属(*Plesiomonas*)丰度显著小于 W1 组。W2 组未分类菌群丰度差异不明显, W1 组中邻单胞菌属(*Plesiomonas*)丰度差异明显。

2.3.3 属水平物种丰度 通过属分类水平上的统计分析, W1 组颜色偏蓝, W2 组颜色偏红, 说明饲喂畜禽内脏乌鳢肠道中菌群丰度高于饲喂冰鲜鱼乌鳢组(图6, 图7); 通过种属分类水平上的统计分析, 确定饲喂冰鲜鱼乌鳢组肠道种属种类较少, 其中优势种属为邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、鲸蜡菌属(*Cetobacterium*), 其他及未分类细菌; 饲喂畜禽内脏乌鳢组肠道种属种类比较丰富, 其中优势种属为狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、*Spartobacteria*、甲基副球菌属(*Methyloparacoccus*)、杆菌属(*Alsobacter*)、*Saccharibacteria*、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、其他及未分类细菌。

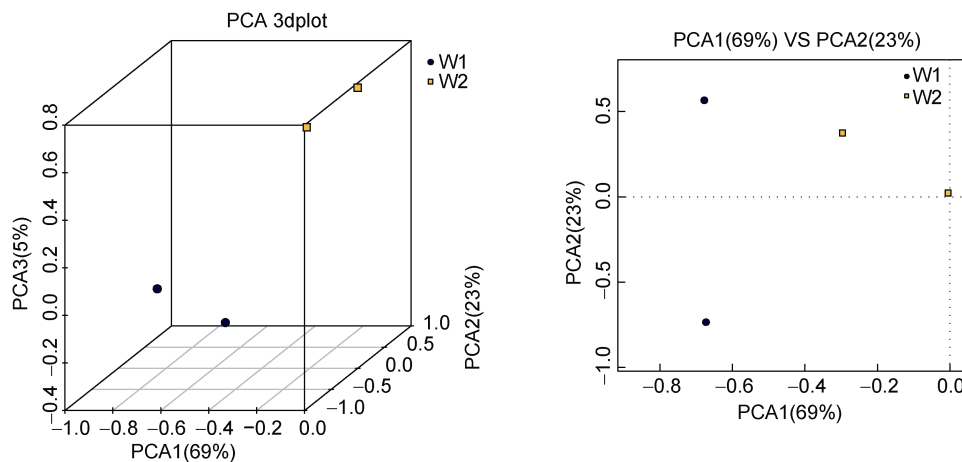


图4 基于 OTU 的 PCA 图

Fig.4 PCA based on OTU

3 讨论

目前很多养殖户为了降低养殖成本, 在乌鳢的养殖过程中投喂畜禽内脏, 投喂畜禽内脏对乌鳢的影响尚未明确。此外, 鱼类是典型的水生脊椎动物, 物种数目繁多, 其消化道中同样栖居着种类繁多的微生物, 发挥着重要的生理功能(王纯, 2017), 肠道中丰富的微生物已被证明对宿主具有举足轻重的影响(Benjamino *et al*, 2018)。水产动物肠道微生物存在于宿主肠道中特定的位置, 并且在宿主体内平衡、代谢、肠道发育、神经发育以及进化等方面发挥重要的作用(邢孟欣, 2013)。为了揭示一定时间内, 冰

鲜鱼、畜禽内脏两种不同饲料的组成是如何影响乌鳢肠道的菌群组成, 课题组设计了本试验。

上述研究结果表明, 投喂冰鲜鱼饲料和畜禽内脏饲料的乌鳢肠道细菌的优势菌群种类和数量方面相似度不高, 差异显著, 而且饲喂畜禽内脏饲料乌鳢肠道细菌的群落种类多样性、OTU丰富度和物种总数均高于饲喂冰鲜鱼乌鳢。饲喂畜禽内脏饲料乌鳢肠道细菌的优势类群为狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、*Spartobacteria*、甲基副球菌属(*methyloparacoccus*)、杆菌属(*Alsobacter*)、*Saccharibacteria*、分支杆菌属

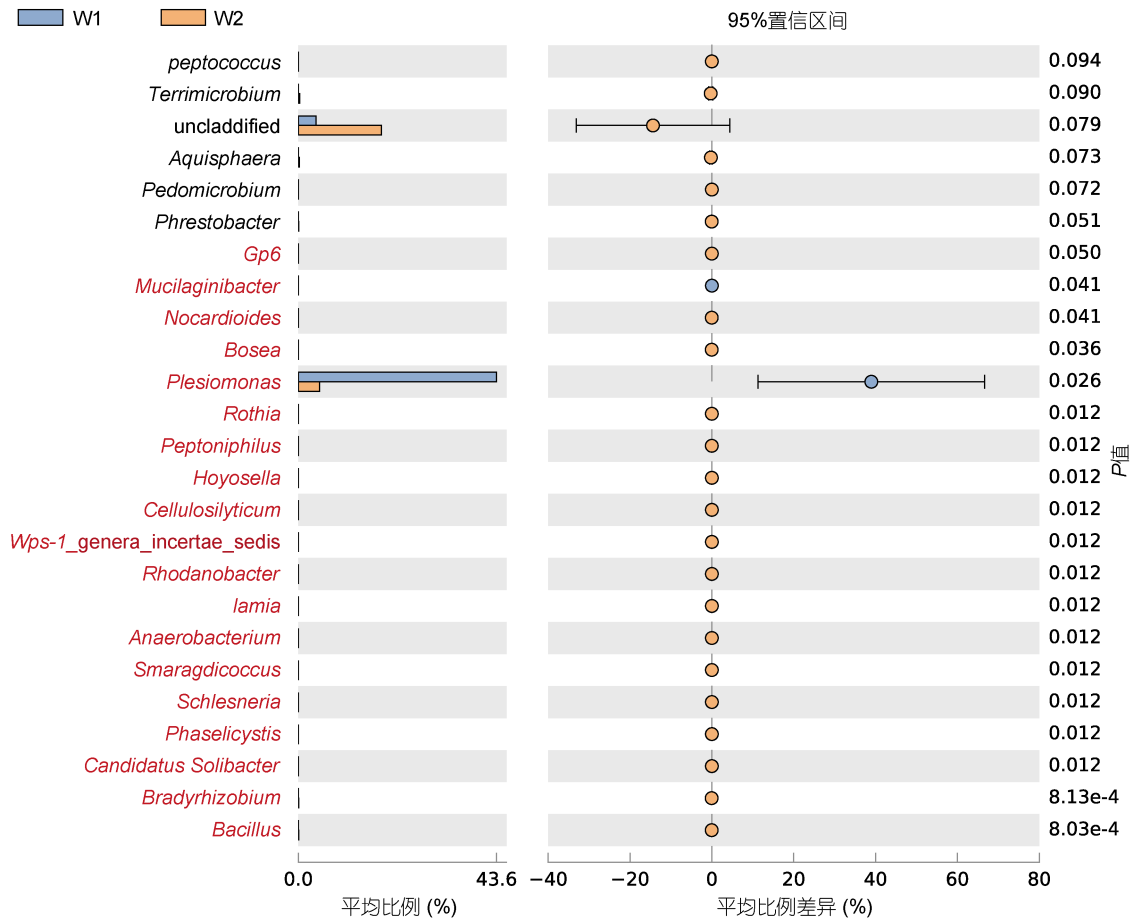


图5 差异比较的误差线图

Fig.5 Error line diagram for difference comparisons

(*Mycobacterium*), 而饲喂冰鲜鱼饲料乌鳢肠道细菌的优势类群为邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、鲸蜡菌属(*Cetobacterium*)。饲喂冰鲜鱼饲料乌鳢和饲喂畜禽内脏饲料乌鳢肠道细菌有2种相同的优势类群, 分别为狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)和邻单胞菌属(*Plesiomonas*), 狭义梭菌属在低蛋白质的饲料生长育肥猪粪便中有显著降低(王晶等, 2018), Fan等(2017)研究表明, 饲料蛋白质水平的降低, 猪回肠中狭义梭菌属的数量明显降低, 分析原因认为是饲料蛋白质水平的降低导致发酵底物氮源的缺乏而引起的。狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)同时是饲喂冰鲜鱼饲料乌鳢和饲喂畜禽内脏饲料乌鳢肠道的优势菌群, 这也与投喂饲料有关, 冰鲜鱼和畜禽内脏均为高蛋白质饲料。De La Rosa(2011)通过454焦磷酸测序技术发现邻单胞菌属是罗非鱼肠道中的优势属之一, 此外, 吴振聪等(2019)利用PCR-DGGE和Illumina测序技术研究了罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道菌群结构, 发现优

势菌属为鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、*Neochlamydia*、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和分支杆菌属(*Mycobacterium*)等6个菌属和一些未知属。邻单胞菌属中的常见菌是一些条件致病菌, 如食用未煮熟的贝类会导致*Plesiomonas shigelloides*感染, 引起腹泻(Holmberg *et al*, 1984, 1986; Niedziela *et al*, 2002)。但Larsen等(2014)对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大嘴鲈(*Micropterus salmoides*)和蓝鳃鲈(*Lepomis macrochirus*)研究表明邻单胞菌属也是肠道中的正常菌群。本研究检测到的邻单胞菌属只能鉴定到属水平, 种水平暂无分类, 其在鱼肠道中的功能有待进一步研究。有研究表明鲸杆菌属能发酵多肽碳水化合物, 还可以生成维生素 B₁₂(Tsuchiya *et al*, 2008), 对鱼类的营养吸收发挥重要的作用。Li等(2015)研究表明鲸蜡菌属可以产生醋酸, 醋酸可促进蛋白质及碳水化合物和脂肪的代谢。冰鲜鱼含有丰富的蛋白质, 且投喂冰鲜鱼乌鳢肠道鲸蜡菌属是优势菌群, 有可能与乌鳢肠道消化

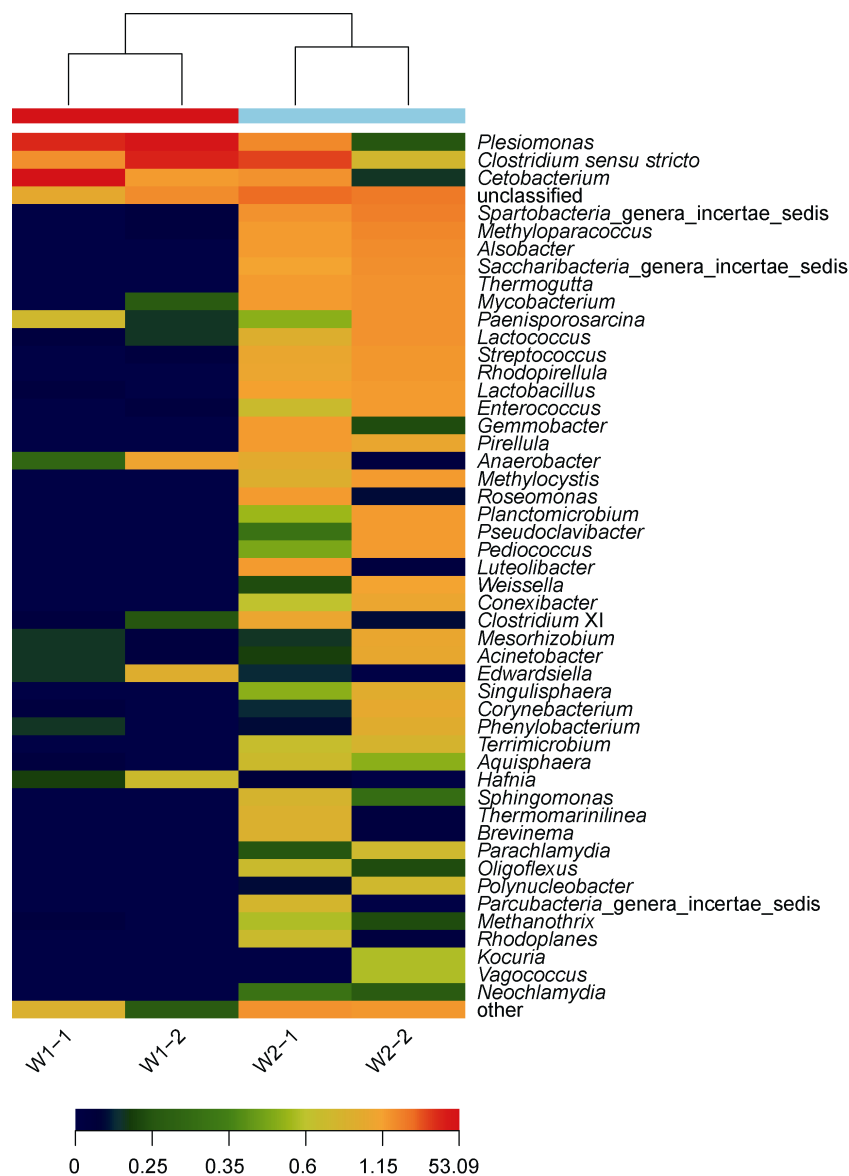


图 6 属分类水平多样本热图

Fig.6 Microbial community heatmap at the genus level

需求有关。Eissa等(2011)在大量急性死亡的石斑鱼肝脏中, Lara-Flores等(2014)在墨西哥大量死亡的罗非鱼中检测到分支杆菌属的细菌, 分支杆菌属中的一些种类如*M. fortuitum*和*M. marinum*, 多与水产动物疾病暴发有关。甲基副球菌属(*Methyloparacoccus*)归属于 γ -变形菌门(Gammaproteobacteria)Type I 型好氧甲烷氧化菌, 好氧甲烷氧化菌主要存在于甲烷和氧气共存的微小界面空间内, 如水-空气界面、土壤-空气、植物根际及植物内部。Hoefman等(2014)于池塘水中发现的一种新型甲烷氧化菌, 该菌在其他鱼类中尚未见报道, 这有可能与乌鳢是底层生物有关。杆

菌属(*Alsobacter*)在土壤中也检测出(Bao *et al*, 2014), 但其功能尚不明确。*Spartobacteria*属在水和南美白对虾肠道中亦被检测出, 其功能亦尚不明确。*Saccharibacteria*属尚未见在水生动物肠道中被检测出的报道。Benjamino等(2018)研究证明饲料组成会影响动物后肠微生物的组成, 但核心的菌群保持相对稳定。不同物种之间肠道微生物细菌群落结构不同, 但在同一物种的特定发育阶段能保持相对稳定(饶刘瑜等, 2018)。不同的水产养殖动物, 乃至相同的水产动物, 其肠道的优势种属不同, 可能反映了饲料、环境、饲养密度和温度对肠道微生物区系的影响。

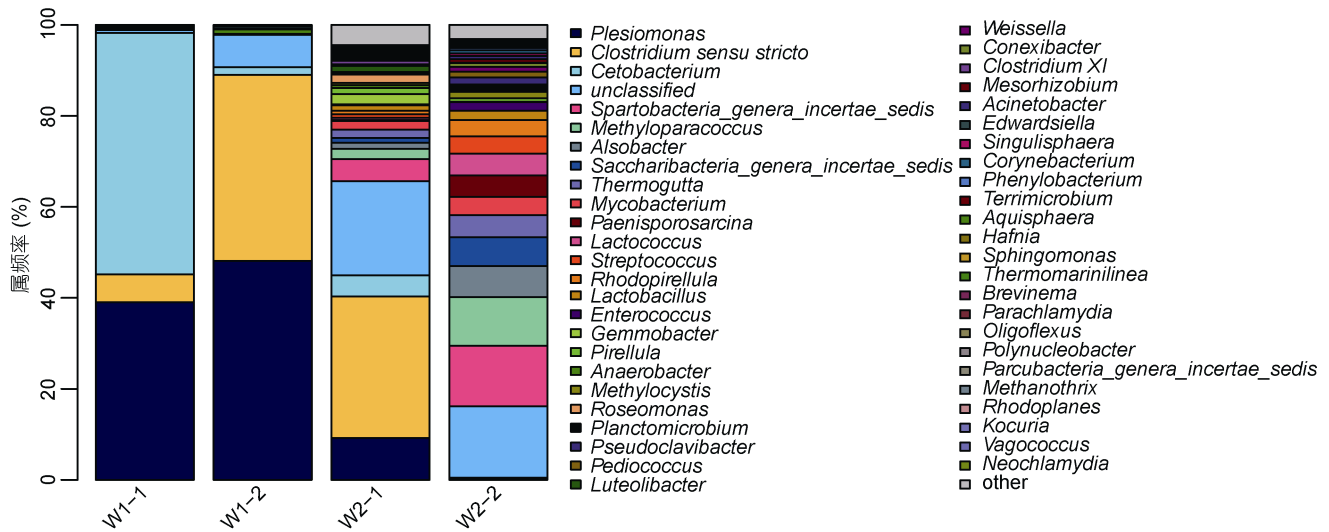


图7 属分类水平所有样本群落结构分布图

Fig.7 Distribution of microbial community at the genus level

4 结论

本研究表明 W1 组饲喂冰鲜鱼饲料和 W2 组饲喂畜禽内脏饲料的乌鳢肠道细菌的优势菌群种类和数量方面相似度不高, 差异显著, 且 W2 组乌鳢肠道细菌群落种类的多样性、OTU 的丰富度和物种的总数均高于 W1 乌鳢肠道; W1 组肠道有益菌 OTU 丰富度大于 W2 组, 且 W2 组还存在一些潜在致病菌, 从乌鳢肠道微生物角度研究, 冰鲜鱼较畜禽内脏更适合作为乌鳢的饲料。

参考文献

- 王 纯, 2017. 芽孢杆菌 V4 和胶红酵母对鲢鳙鱼生长免疫及肠道菌群影响研究. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士学位论文, 196
- 王 晶, 王四新, 刘 辉等, 2018. 低蛋白质水平饲料对生长育肥猪生长性能及肠道菌群的影响. 动物营养学报, 30(12): 4864—4873
- 邢孟欣, 2013. 养殖大菱鲆肠道微生物多样性及功能分析. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 129
- 刘增新, 柳学周, 史 宝等, 2017. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 稚稚幼鱼肠道菌群结构比较分析. 渔业科学进展, 38(1): 111—119
- 吴振聪, 张莎莎, 杨 转等, 2019. 投喂鲍内脏多糖对罗非鱼肠道菌群结构的影响. 中国水产科学, 26(3): 546—558
- 饶刘瑜, 李学梅, 李星浩等, 2018. 转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究. 水生生物学报, 42(2): 349—355
- Bao Z H, Sato Y, Fujimura R *et al*, 2014. *Alsobacter metallidurans* gen. nov., sp. nov., a thallium-tolerant soil bacterium in the order *Rhizobiales*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(3): 775—780
- Benjamino J, Lincoln S, Srivastava R *et al*, 2018. Low-abundant bacteria drive compositional changes in the gut microbiota after dietary alteration. Microbiome, 6: 86
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K *et al*, 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiology, 16(1): 157
- De La Rosa M G N, 2011. Preliminary evaluation of the bacterial populations associated with the intestinal tract of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to essential oils of oregano in the diet. Bogotá: National University of Colombia Faculty of Sciences
- Eissa A E, Zaki M M, Saied S, 2011. Epidemic mortalities in the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in Egyptian coastal waters. In: Proceedings of the 4th Global Fisheries and Aquaculture Research Conference. Giza, Egypt: The Egyptian International Center for Agriculture, 111—122
- Fan P X, Liu P, Song P X *et al*, 2017. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. Scientific Reports, 7: 43412
- Hoefman S, van der Ha D, Iguchi H *et al*, 2014. *Methyloparacoccus murrellii* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from pond water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(6): 2100—2107
- Holmberg S D, Farmer III J J, 1984. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. Reviews of Infectious Diseases, 6(5): 633—639
- Holmberg S D, Wachsmuth I K, Hickman-Brenner F W *et al*, 1986. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. Annals of Internal Medicine, 105(5): 690—694
- Lara-Flores M, Aguirre-Guzman G, Balan-Zetina S B *et al*, 2014. Identification of *Mycobacterium* agent isolated from tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14(1/2): 575—580
- Larsen A M, Mohammed H H, Arias C R, 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable

- warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6): 1396—1404
- Li T T, Long M, Gatesoupe F J *et al*, 2015. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 69(1): 25—36
- Niedziela T, Lukaszewicz J, Jachymek W *et al*, 2002. Core oligosaccharides of *Plesiomonas shigelloides* O54:H2 (Strain CNCTC 113/92): structural and serological analysis of the lipopolysaccharide core region, the O-Antigen biological repeating unit, and the linkage between them. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14): 11653—11663
- Ravel J, Blaser M J, Braun J *et al*, 2014. Human microbiome science: vision for the future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013. *Microbiome*, 2(1): 16
- Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S *et al*, 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS One*, 9(3): e91853
- Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H, 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1): 43—48
- Wu S G, Gao T H, Zheng Y Z *et al*, 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1—4): 1—7
- Xu Z J, Knight R, 2015. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition*, 113(Suppl): S1—S5

EFFECTS OF DIFFERENT FEEDING MATTERS ON INTESTINAL MICROBIAL STRUCTURE DIVERSITY OF *OPHIOCEPHALUS ARGUS*

SHENG Peng-Cheng¹, ZHOU Dong-Ren¹, HAN Xin-Rong², HU Xiao-Bo², YE Xue-Ping¹, XU Lei¹,
ZHOU Dan¹, WU Qi-Fang¹, HAO Gui-Jie¹

(1. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Agriculture Ministry, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

2. Tongxiang Fishery Workstation, Tongxiang 314500, China)

Abstract Snakeheaded fish *Ophiocephalus argus* was fed with different diets. Group W1 were fed with frozen fish and Group W2 with viscera of livestock and poultry. After 12 weeks, intestinal contents were taken and 16S rDNA technique was used to determine the difference in intestinal biodiversity and microbial diversity. Some 51 124 and 39 298 effective intestinal bacterial sequences were obtained in Groups W1 and W2, respectively. Results show that 2631 and 4114 species annotation units (OTUs) were found belonging to 5 and 49 genera in Groups W1 and W2, respectively. The intestinal bacterial species were quite different in the two groups. The dominant species in Group W1 were *Plesiomonas*, *Clostridium sensu stricto*, *Cetobacterium*, and *Clostridium sensu stricto*, while those of Group W2 were *Clostridium sensu stricto*, *Plesiomonas*, *Spartobacteria*, *Methyloparacoccus*, *Alsobacter*, *Saccharibacteria*, and *Mycobacterium*. The Shannon index of Group W2 was higher than that of Group W1, indicating that the diversity of intestinal bacteria in Group W2 was higher than that in Group W1. The results also show that the diversity of intestinal bacteria community, OTU richness, and total number of species fed with livestock and poultry viscera were greater than those fed with frozen fish. The OTU richness of intestinal beneficial bacteria in Group W1 was higher than that in Group W2, but Group W2 had some potential pathogens. This study provided scientific data for healthy cultivation of *O. argus* and potential applications of intestinal microbial resources.

Key words snakeheaded fish *Ophiocephalus argus*; Illumina MiSeq genome sequencing; feeding methods; intestinal microorganisms; community structure