

体外培养法探讨不同蛋白源对大菱鲆肠道菌群的影响

王云爽¹, 皮雄娥², 王欣², 何良^{1,*}

(1. 中国海洋大学 农业部水产动物营养与饲料重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 肠道菌群是动物正常生长发育中必不可少的重要组成部分, 与动物健康密切相关, 高比例的豆粕替代鱼粉作为鱼类饲料蛋白源严重影响了鱼类健康。采用 3 种不同种类的平板培养基对大菱鲆肠道不同部位菌群数量进行了体外模拟培养, 证实了大菱鲆肠道各部位间均存在大量的微生物, 且大菱鲆肠道可培养的需氧菌数量高于厌氧菌, 前肠可培养的微生物数量也相对较多。采用 DGGE 指纹图谱检测和 Bio-rad 的 Quantity One 分析软件研究了蛋白源体外发酵对大菱鲆肠道菌群结构差异的影响。结果表明, 大菱鲆肠道菌群受不同蛋白源的影响, 且厌氧发酵条件下, 发酵豆粕和鱼粉有着相似的主菌群结构。通过对内容物及发酵液的 PCR-DGGE 指纹图谱进行聚类分析和切胶回收, 发现有氧条件下, 菌群种类亲缘关系受蛋白源影响较大, 且变形菌门为大菱鲆肠道利用蛋白的优势菌群。

关键词: 大菱鲆; 蛋白源; 肠道细菌; 体外培养

中图分类号: S567.239

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2016)07-1128-07

Effects of different protein sources on intestinal microbiota structures of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using *in vitro* culture method

WANG Yun-shuang¹, PI Xiong-e², WANG Xin², HE Gen^{1,*}

(1. Key Lab of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The gut of turbot contained a diverse population of bacteria which contributed to food digestion and nutrient absorption. The high substitution rate of soybean meal to fish meal would damage the health of the fish. In the present study, the contents of intestine were diluted and cultured in three plate culture media. The result showed that there were a number of bacteria in every part of the intestine, the number of cultural aerobic bacteria was higher than that of the anaerobic bacteria in the gut of turbot, and the population of upper intestine was higher. The DGGE-profiles showed that the structure of turbot's intestine was influenced by protein sources, and the main bacterial strain was similar when incubated in fishmeal or fermented soybean meal culture under anaerobic condition. Based on the results of the PCR-DGGE-profiles, the relationship of the bacteria species was greatly influenced by different protein sources under aerobic conditions, and proteobacteria was the dominant bacteria in the turbot gut which could utilize the protein.

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 国家 973 计划项目(2014CB038601); 浙江省科技计划项目(2014C32073)

作者简介: 王云爽(1990—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: chrisan@qq.com

* 通信作者, 何良, E-mail: hegen@ouc.edu.cn

Key words: turbot; protein sources; intestinal microbiota; *in vitro* culture

自然界的任何动物,从低等的腔肠动物到人类,肠道中都含有大量的微生物。肠道微生物存在于宿主肠道特定位置,在与宿主的相互作用中影响着宿主的生理、免疫和营养,是动物正常发育中必不可少的重要组成部分,同时,肠道微生物也受环境、饲料等的影响^[1-2]。大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)肉质细嫩鲜美、肌肉丰厚、骨刺少、风味独特,而且适应低水温环境,1992年引进后迅速成为中国重要的肉食性海水养殖种类,但其配合饲料对蛋白质的要求较高^[3]。鱼粉是目前水产饲料的主要蛋白源,由于水产养殖业的迅速发展,养殖产量已超过野生捕捞量,所消耗鱼粉占鱼粉总量的比例也翻了一番。随着鱼粉价格不断上升,为了降低养殖成本,提高收益,鱼类营养学家致力于研究可高比例替代鱼粉的蛋白,以减少水产养殖对鱼粉的依赖^[4-6]。豆粕作为优质的替代蛋白源,在水产饲料中的应用越来越多,但高比例的豆粕替代会影响鱼类健康,相比之下发酵豆粕较其他大豆蛋白更易消化吸收^[7]。但是大量的发酵豆粕替代还是存在障碍,鱼类高效利用豆粕的机制目前尚不清楚。

随着生物技术的迅猛发展,近年来,对鱼类肠道微生物的研究受到广泛关注,投喂不同饲料可以改变鱼类肠道菌群结构组成^[8-9],肠道菌群可以通过影响上皮细胞生长、提供必需营养物质、刺激免疫系统影响鱼类健康^[10]。但饲喂不同蛋白源是否引起鱼类肠道菌群差异,从而影响鱼类健康,进而影响植物蛋白源的高效利用,这类机理性研究目前还未见报道。大菱鲆肠道菌群结构尚不清楚,探讨不同蛋白源对菌群的具体影响还未见报道。本文结合传统培养法与现代分子生物学技术,运用体外培养法研究不同培养条件下大菱鲆肠道不同部位可培养细菌数的差异,并探讨豆粕、发酵豆粕、鱼粉3种蛋白源体外发酵大菱鲆肠道菌群的差异,旨在找到可以利用不同蛋白源的主要菌群种类,为研究大菱鲆肠道菌群对不同饲料蛋白源的利用机理奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

市售大菱鲆,每尾约500 g,剖检时体表、体内无充血、出血现象,肠道充盈度良好且无明显食糜。

2216E琼脂(2216E)和Nutrition Agar(NA)购自青岛高科园海博生物技术有限公司;WILKINS-CHALGREN anaerobe broth(WC)(OXOID)。豆粕液体培养基、发酵豆粕液体培养基及鱼粉液体培养基按豆粕(发酵豆粕、鱼粉)0.05 g·L⁻¹、海盐0.36 g·L⁻¹配制。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

参照Olsson等^[11]的方法并加以改进,具体操作如下:大菱鲆测量体长、体质量后,用75%乙醇棉球擦拭腹部,用灭菌的剪刀剪开,用灭菌棉线将胃前、后肠后结扎并剪下,用0.9%生理盐水将肠道外表面冲洗干净,测量肠道长度及质量。为保证试验数据的可靠性,每次试验将2尾鱼同一部位内容物混合,并进行3次重复试验。

1.2.2 体外培养模拟肠道菌群的计数

肠道转移至厌氧操作台(miniMACS, Anaerobic Workstation)后,将其分为胃(1)、幽门盲囊(2)、前肠(3)、中肠(4)、后肠(5)共5部分。分别取约1 cm,用灭菌刀片刮取内容物至灭菌试管中,称量,其余肠道内容物-80℃冰箱保存。用还原性稀释液^[11]按1:10(W:V)将肠道内容物稀释,涡旋振荡均匀,将其记为10⁻¹,按照10倍稀释法将其稀释至10⁻⁵、10⁻⁶。分别取100 μL涂布2216E平板、NA平板及WC平板,在22℃、有氧条件下倒置培养48 h,22℃、厌氧条件下倒置培养72 h后计数,考察体外培养条件下大菱鲆肠道5部分的可培养菌群的数量差异。

1.2.3 不同蛋白源肠道微生物体外发酵培养

将1.2.2中肠道内容物浓度为10⁻¹的稀释液按5%接种量,分别接种到鱼粉液体培养基、豆粕液体培养基及发酵豆粕液体培养基中,在25℃、有氧条件下培养48 h,25℃、厌氧条件下培养72 h至D₆₀₀值在0.8左右。

1.2.4 PCR-DGGE技术探讨肠道内容物及不同蛋白源体外发酵后菌群结构差异

取 1.2.2 节中的肠道内容物,用 QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)提 DNA。取 1.2.3 节中培养 48 h 后的液体培养基 1 mL,100 r·min⁻¹离心 5 min,取上清,再 10 000 r·min⁻¹离心 1 min,保留沉淀,用 Bacterial DNA Kit(OMEGA)提 DNA。将以上所得混合菌 DNA 进行 16S V3 PCR,引物为 341f: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'和 534r: 5'-GCGGGGGCACGGGGGGCCTACGG-GAGGCAGCAG-3'),用 PCR 产物进行 Reconditioning PCR,引物同上,然后做 DGGE,将主要条带切下测序。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性梯度为 30%~60%(100%变性剂为 7 mol·L⁻¹尿素和 40%去离子甲酰胺),PCR 产物的上样量为每个泳道约 300 ng。50 V、60 °C 电泳 14 h。电泳后凝胶使用 10 000 倍稀释的 SYBR Green I 染色,使用凝胶成像仪进行紫外照相。

1.2.5 DGGE 图谱中优势条带的克隆及测序

从 DGGE 胶带中选取具有代表性条带,切胶,对该片段进行 16S V3 扩增。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体(TaKaRa)16 °C 连接过夜,转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆子,PCR 检测确认阳性克隆。将所得克隆片段送生工生物工程上海(股份)有限公司进行测序。

1.2.6 DGGE 图谱聚类分析

采用 Bio-rad 的 Quantity One 分析软件,通过检测条带、匹配条带、对目的条带进行标记,构建体外不同发酵条件下的菌群多样性聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 大菱鲆肠道不同部位体外模拟培养可培养菌的平板培养结果

分别采用海洋微生物常规培养基(2216E)、营养琼脂培养基(NA)、厌氧专用培养基(WC)来模拟培养大菱鲆肠道 5 部位内容物菌群的可培养菌株,考察了不同培养条件肠道各部位间可培养菌株数量和种类的差异。从表 1 及表 2 可以看出,无论是有氧还是厌氧条件下,3 种培养基培养的肠道各部位都培养出了大量微生物,可见大菱鲆肠道内存在着大量的微生物,且有氧条件下可培养的菌株数量明显高于厌氧条件下可培养的菌株数量;同一培养条件下,前肠的可培养菌株数量相对较多,但不同培养基同一部位可培养菌株的数量无明显差异。

2.2 肠道内容物及不同蛋白源发酵液的 DGGE 指纹图谱

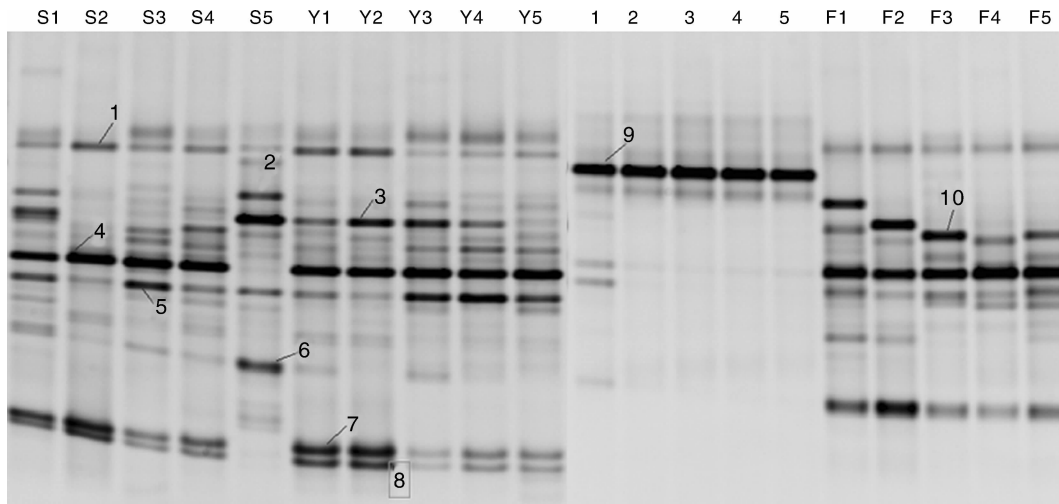
直接接种肠道不同部位内容物至 3 种不同蛋白源培养基中,考察了不同蛋白源体外发酵菌群的差异。图 1 和图 2 为有氧和厌氧条件下,不同蛋白源发酵液的 DGGE 指纹图谱,其中 1—5 分别代表接种前大菱鲆胃、幽门盲囊、前肠、中肠和后肠的内容物 DNA 的指纹图谱,F 代表发酵豆粕液体培养基,S 代表豆粕液体培养基,Y 代表鱼粉液体培养基。不同位置的条带代表不同的细菌,亮度反映出细菌相对量的多少。从图 1、图 2

表 1 有氧条件下大菱鲆肠道不同部位培养菌群的数量

培养基 Medium	胃 Stomach	幽门盲囊 Pyloric ceca	前肠 Upper intestine	中肠 Lower intestine	后肠 Rectum
2216E	7.21~9.50	6.73~8.14	7.94~10.40	7.08~9.08	6.92~9.03
NA	7.05~9.29	6.80~8.00	7.43~10.37	7.09~9.36	6.94~8.95
WC	6.91~9.28	6.67~8.30	6.98~10.21	7.14~9.13	6.93~8.74

表 2 厌氧条件下大菱鲆肠道不同部位培养肠道菌群的数量

培养基 Medium	胃 Stomach	幽门盲囊 Pyloric ceca	前肠 Upper intestine	中肠 Lower intestine	后肠 Rectum
2216E	5.90~8.10	5.86~7.84	5.93~8.90	6.33~8.46	4.84~8.48
NA	5.53~6.79	4.81~8.15	6.22~8.98	6.17~8.47	4.64~8.89
WC	5.62~8.30	5.67~8.11	6.13~8.96	5.99~8.32	5.00~8.43

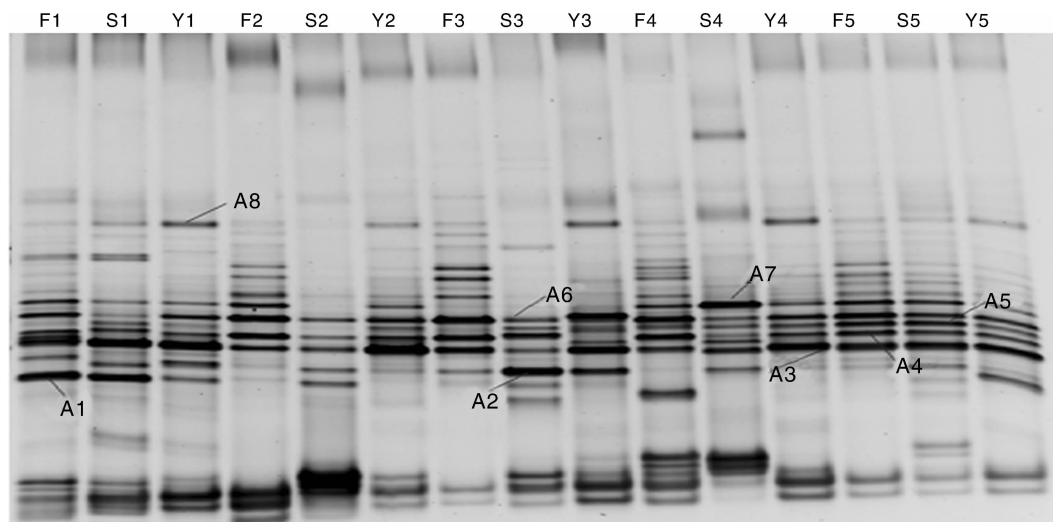


1—5 分别代表接种前大菱鲆胃、幽门盲囊、前肠、中肠和后肠的内容物;F,发酵豆粕液体培养基;S,豆粕液体培养基;Y,鱼粉液体培养基

1—5 represented the content of stomach, pyloric caeca, upper intestine, lower intestine, and rectum. F, fermented soybean meal broth; S, soybean meal broth; Y, fish meal broth

图1 有氧条件下不同蛋白源发酵液中大菱鲆肠道内容物 DNA 的 DGGE 指纹图谱

Fig.1 DGGE profiles of the bacterial diversities collected from the intestine of turbot from different protein sources plate culture under aerobic condition



F,发酵豆粕液体培养基;S,豆粕液体培养基;Y,鱼粉液体培养基

F, fermented soybean meal broth; S, soybean meal broth; Y, fish meal broth

图2 厌氧条件下不同蛋白源发酵液中大菱鲆肠道内容物 DNA 的 DGGE 指纹图谱

Fig.2 DGGE profiles of the bacteria diversities collected from the intestine of turbot from different protein sources plate culture under anaerobic condition

可以看出,接种前大菱鲆肠道内容物细菌条带较少,受限于 DGGE 技术灵敏度的限制,可能一些低峰度的菌株很难检测到。经培养后,无论是

氧还是厌氧条件下,3 种培养基可培养菌的丰度明显增加,且厌氧条件下可检测到优势菌群的条带更为丰富,不同蛋白源培养基培养后,优势菌

群明显。大菱鲆同一肠道部位在不同蛋白源培养基中富集的细菌种类也有明显差别,尤其以幽门盲囊和前肠差异较大,且在厌氧条件下,鱼粉和发酵豆粕培养基主菌群相似度较高,这一结果表明大菱鲆肠道菌群受蛋白源的影响,发酵豆粕和鱼粉有着相似的主菌群结构。

2.3 DGGE 代表性条带克隆测序分析

从有氧条件下的 DGGE 图谱中选出 11 个条

带(图 1),从厌氧培养条件下的 DGGE 图谱中选出 8 个条带(图 2)进行克隆测序,其对应的结果如表 3 所示。其中,4 号 *Vibrio* sp. CR-IV-E26 几乎存在于有氧条件下的所有液体培养基中,*Vibrio* 属菌株占序列分析结果的 1/2。

2.4 DGGE 图谱聚类分析

分别对有氧和厌氧条件下体外发酵的肠道内容物培养液菌株的 DGGE 指纹图谱进行聚类分

表 3 DGGE 凝胶回收条带序列分析结果

Table 3 The sequences of DNA fragments recovered from DGGE gel

条带编号 Band No.	相似菌 Similar bacterium	相似度 Similarity/%	分类 Classification
1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100	<i>Vibrio</i>
2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. xn60	100	<i>Pseudoalteromonas</i>
3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. IMCC17052	100	<i>Pseudoalteromonas</i>
4	<i>Vibrio</i> sp. CR-IV-E26	100	<i>Vibrio</i>
5	<i>Vibrionaceae</i> bacterium GUDS1155	100	<i>Vibrionaceae</i>
6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	<i>Klebsiella.</i>
7	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain NSTH23	100	<i>Vibrio</i>
8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain NSTH23	99	<i>Vibrio</i>
9	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 12	99	—
10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BTCZ27	100	<i>Pseudoalteromonas</i>
11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain NSTH23	100	<i>Vibrio</i>
A1	<i>Vibrio</i> sp. W-137-8	100	<i>Vibrio</i>
A2	<i>Vibrio</i> sp. CIBABR2	100	<i>Vibrio</i>
A3	<i>Vibrio</i> sp. UK	100	<i>Vibrio</i>
A4	uncultured <i>Photobacterium</i> sp.	100	<i>Photobacterium</i>
A5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	<i>Enterobacter</i>
A6	uncultured <i>Photobacterium</i> sp	100	<i>Photobacterium</i>
A7	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus</i>
A8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	<i>Vibrio</i>

析。结果表明,有氧条件下的 20 个条带分成了 2 支,其中,肠道内容物的 5 个条带聚在一起,接种不同部位内容物的同一蛋白源发酵液菌株亲缘关系较接近,尤其是鱼粉蛋白源可培养菌株较为典型;但厌氧条件下的 DGGE 指纹图谱的聚类分析比较分散,没有显示出同种蛋白源的聚类现象,说明亲缘关系可能相差较远。聚类分析的结果表明,有氧条件下大菱鲆不同部位的菌群结构亲缘关系受蛋白源的影响较大。

3 结论与讨论

用 3 种不同培养基培养大菱鲆肠道内容物细菌,其中,2216E 琼脂是用来培养海水细菌的常规培养基^[12];NA 是一种无选择性的较低营养

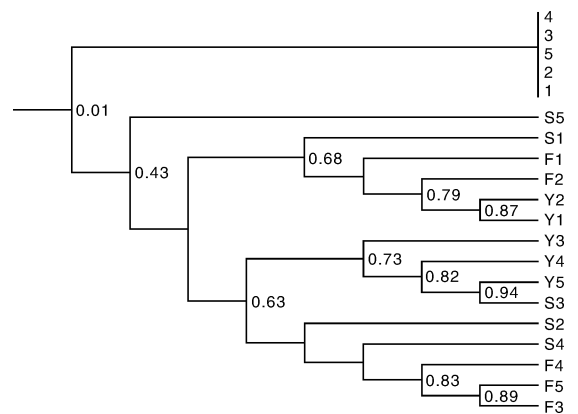


图 3 有氧条件下不同蛋白源发酵液的 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of DGGE profiles obtained from different protein fermentation under *in vitro* aerobic condition

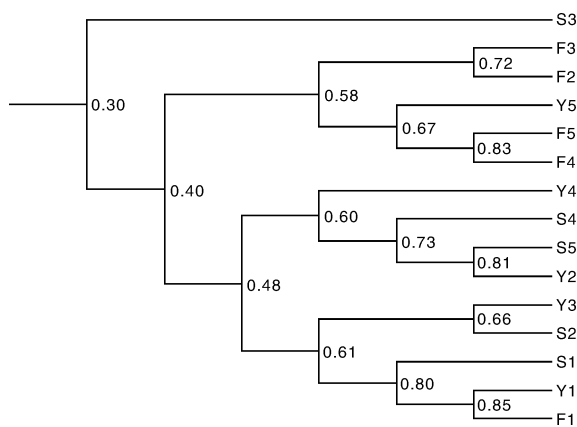


图4 厌氧条件下不同蛋白源发酵液的 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of DGGE profiles obtained from different protein fermentation under *in vitro* anaerobic condition

成分的培养基,主要用于菌落计数的固体培养基;OXOID 主要用于厌氧菌的筛选计数^[13]。计数发现,大菱鲂肠道内不同部位均存在大量的微生物。3 种培养基所得细菌数量没有明显差异,一方面可能是因为培养时间较短,差异表现不明显;另一方面也间接说明,大菱鲂肠道内可培养细菌的数量受特定营养要求的限制,例如特殊的营养、培养温度、pH 等^[14],因此,很难提供恰当的营养条件来培养复杂的肠道内容物菌群^[15],这 3 种培养基也只能培养出部分可培养的优势菌群。而且,有氧培养条件下可培养的细菌数量较多,可见,大菱鲂肠道内细菌主要以有氧及兼性厌氧为主。有关文献报道表明,大菱鲂肠道中包含的菌群数量基本固定在每 g 内容物 $10^7 \sim 10^8$ 个细菌^[16-18]。无论是有氧还是厌氧条件下,从前肠到后肠,细菌数量逐渐降低,这与淡水鲤科鱼类如鲤鱼 *Cyprinus carpio*^[19]、草鱼 *Ctenopharyngodon idellus*^[20] 肠道菌群的数量具有从前肠至后肠逐渐增多的现象正好相反。这可能是由于肉食性鱼类肠道较短,而且海水鱼的消化主要集中在胃部^[21],前肠的环境较适合细菌的生长。

鱼类的微生物菌群结构要比恒温动物相对简单得多^[22-23],大菱鲂肠道内容物的 DGGE 指纹图谱正好与此相符,肠道 5 部分内容物的条带并没有明显区别,只有 1 条较明显的共有条带 9 (Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 12),

但切胶回收并没有测出其种类,属于未知菌株,可能是空腹的大菱鲂在营养缺乏的状态下,很多菌株丰度较低, DGGE 技术没有检测出。在 3 种不同培养基中接种肠道内容物进行培养后,无论是进行有氧切胶测序还是厌氧切胶测序,结果显示,95% 以上条带都属于变形菌门,说明可以利用培养基中蛋白源的主要菌群为变形菌门, XING 等^[24] 通过不同固体培养基培养大菱鲂肠道内容物,并挑选单菌落进行分离鉴定,发现 82% 属于变形菌门。通过对 DGGE 指纹图谱进化树分析发现,在有氧条件下,不同肠道内容物因为在同一种培养基中培养而富集在一起,而在厌氧条件下,肠道内容物菌群亲缘关系并没有明显受到培养基的影响,说明需氧菌更易受到培养基蛋白源的影响。

3 种不同固体培养基体外模拟培养大菱鲂肠道内容物菌群,平板菌落数计数结果均为每 g 内容物 $10^7 \sim 10^{10}$,证实了大菱鲂肠道内存在大量的微生物。3 种培养基均表现出有氧条件下可培养的菌株数量明显高于厌氧条件下可培养的菌株数量;同一培养条件下,前肠的可培养菌数量相对较多,说明了前肠可能是适合大菱鲂肠道菌群生长的重要部位,但不同培养基同一部位之间可培养菌株的数量无明显差异。不同蛋白源发酵后的 DGGE 图谱分析表明,大菱鲂肠道菌群种类的丰度受培养条件和蛋白源底物的影响,不同蛋白源富集了不同丰度的菌株,同一蛋白源厌氧条件下菌群种类更为丰富。从聚类分析的结果可知,在有氧条件下,菌群种类受蛋白源影响较大。但本文仅从体外培养、氧气的存在与否角度探讨了大菱鲂肠道菌群受不同蛋白源的影响,在实际养殖条件下,对大菱鲂饲喂不同蛋白源肠道导致的菌群的具体差异还在进一步分析中。围绕肠道菌群的差异变化探讨大菱鲂对不同蛋白源的利用机理还有待深入的研究与分析。

参考文献 (References):

- [1] BAKKE-MCKELLEP A M, PEMN M H, SALAS P M, et al. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2007, 97(4): 699-713.

- [2] RINGO E, SPERSTAD S, MYKLEBUST R, et al. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(9): 891–897.
- [3] 王际英, 李宝山, 王世信, 等. 不同加工工艺的饲料对大菱鲆幼鱼生长及养殖水环境的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 60–67.
WANG J Y, LI B S, WANG SH X, et al. Effect of different feed processing on the growth and the aquaculture environment of turbot juvenile *Scophthalmus maximus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 60–67. (in Chinese with English abstract)
- [4] HIEN T T T, BE T T, LEE C M, et al. Development of formulated diets for snakehead (*Channa striata* and *Channa micropeltes*): Can phytase and taurine supplementation increase use of soybean meal to replace fish meal? [J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 334–340.
- [5] HARDY R W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(5): 770–776.
- [6] NAYLOR R L, HARDY R W, BUREAU D P, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(36): 15103–15110.
- [7] LUO L, XUE M, WU X, et al. Partial or total replacement of fishmeal by solvent-extracted cottonseed meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 12(6): 418–424.
- [8] RINGO E, SPERSTAD S, KRAUGERUD O F, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(10): 1087–1100.
- [9] HARTVIKSEN M, VECINO J L G, RINGO E, et al. Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(4): 381–398.
- [10] NAYAK S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): 1553–1573.
- [11] 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.
- [12] SHIGEMATSU T, HAYASHI M, KIKUCHI I, et al. A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 293(2): 240–247.
- [13] WILKINS T D, CHALGREN S. Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1976, 10(6): 926–928.
- [14] VARTOUKIAN S R, PALMER R M, WADE W G. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(1): 1–7.
- [15] KIM B S, KIM J N, CERNIGLIA C E. *In vitro* culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota [J]. *BioMed Research International*, 2011: 838040.
- [16] AUSTIN B. The bacterial microflora of fish, revised [J]. *The Scientific World Journal*, 2006, 6: 931–945.
- [17] GOMEZ G D, BALCAZAR J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 52(2): 145–154.
- [18] PEREZ T, BALCAZAR J L, RUIZZARZUELA I, et al. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem [J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3(4): 355–360.
- [19] 杨雨辉, 佟恒敏, 卢彤岩, 等. 乳酸环丙沙星对鲤鱼肠道菌群的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(10): 38–40.
YANG Y H, TONG H M, LU T Y, et al. The effect of ciprofloxacin on microflora in intestine of carp [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 30(10): 38–40. (in Chinese)
- [20] 周文豪, 陈孝焯, 张冬晓, 等. 摄食不同饲料对草鱼肠道菌群影响的研究[J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 252–256.
ZHOU W H, CHEN X X, ZHANG D X, et al. A preliminary study on the influence of different feeding stuff on intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Huazhong Agriculture University*, 1998, 17(3): 252–256. (in Chinese with English abstract)
- [21] 冯晓燕. 许氏平鲉(*Sebasteschlegela*) 消化道组织学、组织化学及酶学研究[D]. 青岛: 青岛海洋大学, 2001.
FENG X Y. A study of the histology, histochemistry and enzymology on the digestive tract of the *Sebastes schlegeli* [D]. Qingdao: Ocean University of Qingdao, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [22] TRUST T J, SPARROW R A H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1974, 20(9): 1219–1228.
- [23] 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.
- [24] XING M X, HOU Z H, QU Y M, et al. Enhancing the culturability of bacteria from the gastrointestinal tract of farmed adult turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(2): 316–325.