

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(2):251-255; 4 February 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 饲喂肉杆菌 Hg4-03 对贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌生物多样性的影响

穆冬冬, 王中康, 殷幼平\*

(重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400030)

**摘要:**【目的】研究贡嘎蝠蛾幼虫肠道优势菌肉杆菌 (*Carnobacterium* sp.) Hg4-03 作为食物添加剂对实验室饲养的 4 龄贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌群的影响。【方法】采用 16S rDNA 序列与 PCR/DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 分析技术相结合的方法, 健康幼虫被随机分为处理组 1、处理组 2 和对照组, 两组处理组分别饲喂添加不同浓度肉杆菌 Hg4-03 的天然饲料, 对照组只饲喂天然饲料。14 d 和 28 d 后每组随机解剖 6 条幼虫, 收集肠道样品, 经细菌通用引物扩增细菌 16S rDNA, DGGE 分离并进行细菌多样性图谱分析。【结果】饲喂肉杆菌 Hg4-03 后幼虫肠道菌群的多样性指数呈上升趋势; 处理组幼虫肠道中肉杆菌 Hg4-03 含量增加, 且处理组中枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的量也明显增加。【结论】将肉杆菌 Hg4-03 作为益生菌饲喂贡嘎蝠蛾幼虫有助于维持幼虫肠道菌群多样性平衡, 这为贡嘎蝠蛾人工或半人工养殖提供了一定的参考价值。

**关键词:** PCR/DGGE; 贡嘎蝠蛾幼虫; 肉杆菌 Hg4-03; 肠道菌群; 益生菌添加

**中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0251-05

正常昆虫肠道内栖息着大量的微生物。正常菌群作为宿主的组成部分, 参与了昆虫体的营养<sup>[1]</sup>、免疫<sup>[2]</sup>、生物拮抗等多种功能以及动物发生、发展和衰退的全过程。正常情况下, 昆虫与菌群保持动态的微生物平衡, 宿主处于健康状态; 当某些因素作用使平衡打破, 正常菌群发生改变, 有害菌占优势时, 会引起宿主的病变反应。近年来, 添加一些功能性正常菌群 (益生菌) 对维持动物肠道微生物平衡, 提高机体健康水平日益受到人们的重视<sup>[3]</sup>。添加益生菌, 重建肠道微生物的正常平衡已被广泛应用于畜牧业及鱼虾类养殖业生产中<sup>[4-6]</sup>, 但鲜有将益生菌作为添加剂饲喂经济昆虫以及添加饲喂后对肠道微生物区系及多样性的影响的报道。

冬虫夏草是我国传统珍贵中药材, 它是中华虫

草菌 (*Cordyceps sinensis*) 寄生于昆虫纲、鳞翅目、蝙蝠蛾科、蝠蛾属昆虫形成的虫、菌结合体。贡嘎蝠蛾是冬虫夏草的优势寄主之一, 生活在四川、西藏等高海拔 3000m 以上的高寒草甸地带。其幼虫生长发育缓慢, 在人工 (或半人工) 饲养条件下生活力弱、易受病菌感染、存活率低 (仅为 3% - 5%)<sup>[7]</sup>, 严重制约了冬虫夏草的规模化培育。本实验室从野生贡嘎蝠蛾幼虫肠道分离出一株肉杆菌 (*Carnobacterium* sp.) 属菌株, 命名为 Hg4-03, 该菌株是贡嘎蝠蛾肠道的优势细菌, 研究发现它对贡嘎蝠蛾幼虫具有一定的促生长作用<sup>∇</sup>。本实验利用 PCR-DGGE 技术及生物信息分析技术研究添加肠道肉杆菌 Hg3-04 后对贡嘎蝠蛾幼虫肠道微生物多样性的影响, 探索肉杆菌 Hg4-03 在蝠蛾幼虫肠道菌群发育过程中的

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30572325)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@sina.com

**作者简介:** 穆冬冬 (1985-), 男 (回族), 安徽颍上人, 硕士研究生, 从事昆虫微生物多样性研究。E-mail: movdon@163.com

**收稿日期:** 2009-08-20; **修回日期:** 2009-09-25

作用,可为理解益生菌的作用机理提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试细菌:**肉杆菌 Hg4-03 菌株,分离于野生贡嘎蝠蛾幼虫肠道<sup>[8-9]</sup>。长期保存在  $-80^{\circ}\text{C}$ ,活化后的 Hg4-03 菌株接种至 LB 液体培养基中, $15^{\circ}\text{C}$  培养 60 h 后,稀释得到浓度为  $6.02 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$  的细菌培养液,用于饲喂试验。

**1.1.2 供试幼虫:**贡嘎蝠蛾 4 龄幼虫由重庆中药研究所四川虫草基地提供。所有幼虫均单头饲养于装有高山草甸土的罐头瓶中,以蝠蛾天然寄主植物珠芽蓼根作为饲料,温度  $15^{\circ}\text{C}$ ,土壤相对湿度 30% - 40%,光照 15 - 16 h/d。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**DGGE 电泳分析系统 (Bio-Rad, USA),PCR 仪 (Bio-Rad, USA),高速冷冻离心机 (Beckman, Germany),核酸蛋白检测仪 (Beckman, Germany);DNA 纯化试剂盒、Taq 酶 (Takara, Japan),pMD-18T (Takara, Japan),引物合成 (上海生工生物技术公司,中国),Axygen 细菌 DNA 提取试剂盒 (Axygen, USA)。

### 1.2 微生物添加试验

实验前,选择大小相似的健康 4 龄幼虫,分为 3 组,其中两组为处理组、另一组为对照组。处理组 1 组:向幼嫩珠芽蓼根段中加入供试细菌悬液,混合均匀,每 g 根段含 1 mL Hg4-03 细菌培养液;处理组 2 组:向幼嫩珠芽蓼根段中加入供试细菌,混合均匀,每 g 根段含 2 mL Hg4-03 细菌培养液;对照组食物不加供试菌而添加 2 mL 灭菌水,正常饲养。每 3d 更换 1 次新鲜食物。每组 3 个重复,每个重复含 14 头幼虫。分别于 14 d 和 28 d 后解剖幼虫,提取肠道微生物 DNA 检测微生物多样性。

### 1.3 肠道微生物 DNA 样品制备

分别从每组供试幼虫中随机取出 6 只幼虫,蒸馏水冲洗后用 75% 酒精擦拭幼虫体表;无菌条件下解剖幼虫,取出完整肠道,加入 1 mL 灭菌蒸馏水,冰浴下匀浆。以细菌基因组提取试剂盒提取肠道细菌总 DNA,并以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。总 DNA 稀释 25 倍后,以核酸蛋白检测仪测定浓度。

### 1.4 微生物多样性分析

**1.4.1 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增:**分别以各组幼

虫肠道细菌总 DNA 为模板,用细菌通用引物 F357 (5'-GCclamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R518 (5'-ATTACCGGGCTGCT GG-3') 进行 PCR 扩增。50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系,扩增程序: $94^{\circ}\text{C}$  4 min; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $52^{\circ}\text{C}$  45 s, $72^{\circ}\text{C}$  30 s,30 个循环; $72^{\circ}\text{C}$  2 min。扩增结束后于 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物并采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收(各样品等体积回收)。

**1.4.2 DGGE 分离及条带分析:**上述 PCR 产物浓缩后,各取 30  $\mu\text{L}$  在垂直电泳系统中进行 DGGE 电泳分析。变性梯度胶配制为:8% (W/V) 的聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺 = 37.5:1, W/W),变性剂尿素与甲酰胺线性浓度范围为 35% - 50% (100% = 7mmol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺 [V/V]);电泳条件为: $60^{\circ}\text{C}$  恒温,200 V 电泳 5 h。电泳结束后 EB 染色 30 min,凝胶成像系统成像,切下清晰条带,置于 1.5 mL 离心管中,加入无菌水 30  $\mu\text{L}$ ,用灭菌牙签捣碎胶条, $-20^{\circ}\text{C}$  浸泡过夜,取溶液作为模板,再次进行 PCR 扩增,引物及反应条件同上。二次 PCR 产物用凝胶纯化试剂盒纯化后连接到 pMD18-T 载体,转化到 *E. coli* JM109 中;克隆经 M13 通用引物检测后,每个条带随机挑取 3 个阳性克隆测序,测序结果于 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 上进行比对分析,寻找同源性最高的序列。使用软件 Quantity One-1-D 软件分析肠道微生物 DGGE 分离图像。

因为 DGGE 分离条带的亮度与 DNA 含量呈正比关系,所以用每个条带的亮度值对该列所有条带平均亮度值的比值  $P_i$ ,计算幼虫肠道 Shannon-Weaver 多样性指数 ( $H$ )<sup>[10]</sup>。

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

数据分析采用 DPS v3.01 软件数据处理系统,显著性分析采用 Duncan 新复极差法。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同处理幼虫生活力的差异

试验结果显示,不同处理幼虫生活力有明显差异。两组试验组幼虫的存活率和体重增长率、幼虫生活力均高于对照组幼虫,且幼虫肠道主要消化酶活性也有不同程度的升高(结果另文发表)。试验中对照组 3 个重复中共有 12 头幼虫表现出亚健康

状况,这些幼虫表现以下特征:表皮较健康幼虫黯淡(呈暗褐黄色)、缺乏光泽,触摸感觉体软缺乏弹性;爬行迟缓;对外界刺激不敏感;取食量极少。

## 2.2 不同处理幼虫肠道菌群多样性变化

对添加益生菌饲养的 4 龄贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌群的 DGGE 图谱分析显示有 11 个不同的明显 DNA 条带,其中有 8 条为不同处理幼虫肠道的共有条带,表明这些条带基因所代表的细菌是贡嘎蝠蛾幼虫肠道中的优势常驻菌群,在幼虫不同生长发育时期和饲养条件下均存在幼虫体内(图 1),通过对比发现 Hg-b、Hg-c 和 Hg-d 三条带有较大差异,处理组幼虫在饲喂 28 d 后,其肠道细菌 16S rDNA 序列电泳图谱中 Hg-b 条带一直保持高亮度,对照组电泳图谱中 Hg-b 条带在处理 14 d 后较处理组变暗,28 d 后几乎消失;饲喂 28 d 后,两组处理组幼虫肠道中对应的 Hg-d 和 Hg-c 条带亮度也高于对照组,而 Hg-e 和 Hg-f 条带亮度变化不明显。克隆测序分析表明: Hg-b、Hg-c、Hg-d、Hg-e 和 Hg-f 条带分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),柠檬酸细菌属(*Citrobacter*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),鞘氨醇杆菌属(*Sphingobium*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌(表 1)。

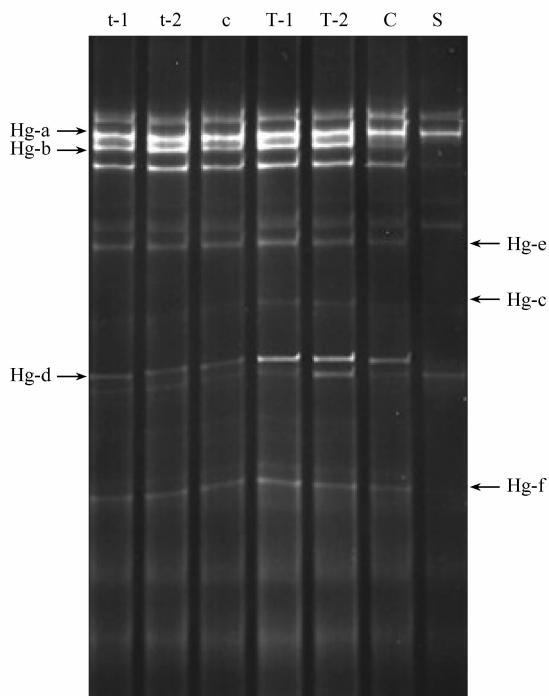


图 1 4 龄贡嘎蝠蛾 *H. gonggaensis* 幼虫肠道细菌 16S rDNA DGGE 图谱

Fig. 1 16 S rDNA DGGE profiles of *H. gonggaensis*' intestinal microba from different treated larvae. t-1: Treatment group 1, 14d; t-2: Treatment group 2, 14d; c: Control group, 14d; T-1: Treatment group 1, 28d; T-2: Treatment group 2, 28d; C: Control group, 28d; S: Subhealthy sample.

由图 2 可见,两个时间段内,处理组幼虫肠道细菌多样性指数均高于对照组肠道细菌多样性指数( $P < 0.05$ ),我们也可以看出,添加益生菌后贡嘎蝠蛾幼虫细菌多样性指数有随添加量增加和饲喂时间延长而增加的趋势;而不添加益生菌的对照组其多样性指数最低。

分析亚健康幼虫的 DGGE 图谱发现,它们肠道中的某些正常的肠道优势细菌消失,其中 Hg-b, Hg-c, Hg-d, Hg-e 和 Hg-f 条带已无法检测出。对其图谱进行分析表明,菌群多样性指数为 1.99,相对于健康幼虫,其肠道细菌多样性指数明显降低。

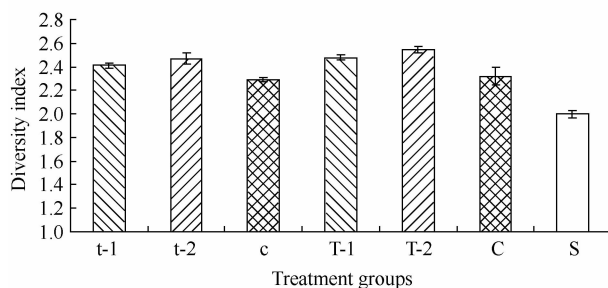


图 2 幼虫肠道菌群多样性指数

Fig. 2 Diversity index of intestinal bacterial community of larvae. t-1: Treatment group1, 14d; t-2: Treatment group2, 14d; c: Control group, 14d; T-1: Treatment group1, 28d; T-2: Treatment group2, 28d; C: Control group, 28d; S: Subhealthy sample.

## 2.3 肉杆菌 Hg4-03 细菌在幼虫肠道的丰度变化

DGGE 电泳图谱显示,对照组和实验组均存在 Hg-a 条带,切胶测序分析表明该条带所代表的 16S rDNA 序列为添加的 Hg4-03 (EU304249)。饲喂 14 d 时,益生菌两种添加量饲喂的幼虫样品图谱中条带 Hg-a 与对照组无亮度差异。但随着饲喂时间的增加,28 d 后与对照组相比,益生菌添加样品的 DNA 图谱中该条带亮度有明显增加。以上结果表明,Hg4-03 菌株在正常对照组幼虫肠道内均是优势菌,而对幼虫添加饲喂 Hg4-03 菌株后该菌株在幼虫肠道内的丰度进一步增加。

## 3 讨论

应用益生菌饲喂经济动物,以提高宿主的生长效率和抗逆力是促进未来养殖业发展的重要手段。国内外许多研究已证明,益生菌在鱼类、哺乳类动物饲养中有很好的效果<sup>[4-6]</sup>,但在经济昆虫方面应用较少。本试验以从野生贡嘎蝠蛾幼虫肠道中分离得到的菌株肉杆菌 Hg4-03 饲喂实验室条件下饲养的贡嘎蝠蛾幼虫,发现添加肉杆菌 Hg4-03 对贡嘎蝠蛾幼虫肠道微生物多样性和优势菌群都产生明显的影响。

表 1 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱序列比对结果

Table 1 Sequences analysis of 16S rDNA recovered from single band in DGGE bacterial fingerprints

Band No.	Length/bp	Sequence accession numbers	Close known species found in the GenBank database	Percentage of similarity/%
Hg-a	192	GQ374448	Uncultured bacterium clone nbw364c11c1 (GQ076377.1)	100
			<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain LHICA_36_4 (FJ656722.1)	100
			* Uncultured <i>Carnobacterium</i> sp. clone Hg5-47 (EU344957.1)	100
			* <i>Carnobacterium</i> sp. Hg4-03 (EU304249.1)	100
Hg-b	190	GQ374446	* Uncultured bacterium clone HG1-02 (EU139495.1)	100
			<i>Pseudomonas</i> sp. RF-58 (GQ205100.1)	98
			<i>Pseudomonas marginalis</i> strain EII-2 (FJ613550.1)	98
Hg-c	192	GQ374447	<i>Citrobacter freundii</i> strain ATCC 8090 (FJ971857.1)	99
			<i>Citrobacter</i> sp. enrichment culture clone W2 (FJ205697.1)	99
Hg-d	193	GQ380693	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZT-4-5 (GQ199599.1)	100
			<i>Bacillus</i> sp. JR56 (GQ180177.1)	100
			<i>Bacillus atrophaeus</i> strain IEO (GQ169374.1)	100
Hg-e	167	GQ871741	Uncultured <i>Sphingobium</i> sp. Clone G13-M-9-G03 (FJ191679.1)	100
Hg-f	192	GQ871742	<i>Enterobacter</i> sp. B4 (GQ304785.1)	100

Sequences with asterisk were from 16S rDNA of *H. gonggaensis*' intestinal microba submitted by our labrotary.

菌群多样性指数是反映菌群区系平衡的重要指标,通常该指数越高,细菌多样性平衡就越难被打破。等翅目昆虫,如白蚁等有着复杂的肠道,容易构建有差异的微环境,因此其肠道微生物多样性指数较高;鳞翅目昆虫肠道较直,结构简单,因此肠道微生物多样性指数较低<sup>[11-12]</sup>,本研究中,试验中亚健康幼虫肠道微生物多样性明显降低,说明肠道菌群平衡确实与贡嘎蝠蛾幼虫生活力相关,但这种相关性究竟是因还是果还值得进一步的试验与分析。根据我们的前期研究,饲料中添加肠道优势肉杆菌 Hg4-03 可以增加幼虫生活力、提高幼虫存活率、提高幼虫肠道主要消化酶活性,因此可以推测,长期人工饲养下的贡嘎蝠蛾其肠道微生物平衡容易被打破,而肠道菌群的失衡又可能反过来影响幼虫对食物的消化,自身的免疫等。在饲喂处理 14 d 和 28 d 后两组处理组和对照组健康幼虫肠道菌群多样性指数均维持在一个相对较高的水平,这表明与亚健康幼虫相比,健康幼虫肠道菌群处在一个相对平衡的状态。同时,各组中均存在代表肉杆菌 Hg4-03 的 Hg-a 这一主带,说明 Hg4-03 菌株普遍存在于贡嘎蝠蛾肠道内。

根据 DGGE 原理,图谱中不同位置的条带代表不同的细菌。但是由于 DGGE 分离效率的限制,理论上只有占样品菌群总含量的 1% 以上的细菌才能在 DGGE 图谱中出现条带<sup>[13]</sup>。通过比较处理组和对照组的 DGGE 图谱发现,28 d 后对照组幼虫肠道中一与 *Pseudomonas fluorescens* (Hg-b) 最相似的优势细菌对应 DNA 条带亮度显著降低,而该菌在亚健康幼虫体内已无法检测到,这说明亚健康幼虫肠道中该菌占总菌群的比例已经下降到很低水平,以至于未能在 DGGE 图谱中出现条带,因此提示该菌可能对宿主健康有益。处理组中另一种随处理时间延长而在数量上呈上升趋势的细菌,经克隆测序后发现其为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Hg-d)。枯草

芽孢杆菌作为益生菌应用于鱼虾类养殖已有相关报道<sup>[4]</sup>,经饲喂枯草芽孢杆菌后宿主肠内各主要消化酶均有所提高有助于宿主更好地吸收营养物质。另外枯草芽孢杆菌自身能够合成 VC、VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub> 和 VB<sub>6</sub>,具有促进宿主生长的功能。因此该菌的存在可能是幼虫生活力提高的重要原因之一。

肉杆菌属细菌作为益生菌饲喂昆虫的研究目前仍处于探索阶段,但已有将该菌属作为益生菌饲喂鱼类 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 和 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) 的报道<sup>[14]</sup>。本研究试验结果显示,添加饲喂肉杆菌 Hg4-03 菌 28 d 后两组处理组幼虫图谱中代表肉杆菌 Hg4-03 的条带得到加强,且菌群多样性指数有所增加,表明饲喂肉杆菌 Hg4-03 优势细菌有助于维持幼虫肠道菌群多样性平衡,并且其本身能够在幼虫体内增殖,可能也具有益生菌功能,可以在贡嘎蝠蛾人工或半人工养殖中利用。而该菌属细菌作为昆虫体内的一种内源菌,在天然蝠蛾幼虫中广泛存在,还没有关于其安全性的报道。如果在蝠蛾饲养中人工添加饲喂,其对人体健康的影响还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Dillon RJ, Charnley AK. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 2002, 153 (8): 503-509.
- [2] Dillon RJ, Charnley AK. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: in vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, 66: 72-75.
- [3] Fuller R. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66: 365-378.
- [4] Wang YB, Xu Z. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and*

- Technology*, 2006, 127 283-292.
- [ 5 ] 高建忠, 秦顺义, 黄克和. 富硒益生菌对仔猪抗氧化和免疫功能的影响. *营养学报 (Acta Nutrimenta Sinica)*, 2006, 28(2): 132-134.
- [ 6 ] Jin LZ. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *The American Society For Microbiology*, 2000, 66 (10): 4200-4204.
- [ 7 ] 尹定华, 付善全, 李泉森. 贡嘎蝠蛾幼虫生物学特性的观察. *昆虫知识 (Entomological knowledge)*, 1995, 32(5): 289-291.
- [ 8 ] 刘莉, 王中康, 俞和韦, 等. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(5): 616-622.
- [ 9 ] Yu HW, Wang ZK, Liu L, et al. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current Microbiology*, 2008, 56: 391-396.
- [10] Yang CH, Crowley DE. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66:345-351.
- [11] Tanada Y, Kaya HK. *Insect Pathology*. New York: Academic Press, 1993: 12-51.
- [12] 相辉, 黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系. *昆虫知识 (Chinese Bulletin of Entomology)*, 2008, 45 (5) 687-693.
- [13] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64: 3854 - 3859.
- [14] Robertson PAW, O' Dowd C, Burrells C, et al. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 2000, 185. 235 - 243.

## Changes of intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae after feeding with *Carnobacterium* sp. Hg4-03 as a probiotic strain

Dongdong Mu, Zhongkang Wang, Youping Yin \*

(College of Bioengineering of Chongqing University, Genetic Engineering Research Centre of Chongqing University, Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We investigated the influence of *Carnobacterium* sp. Hg4-03 on intestinal microflora of the 4<sup>th</sup> instar *Hepialus gonggaensis* larvae, an economically important insect. [ **Methods** ] The effect was observed by molecular techniques based on the sequence of 16S rDNA V3 region gene and PCR/DGGE ( Denaturing gradient gel electrophoresis). The health larvae were divided randomly into treatment group1, treatment group2 and control group, and fed on their natural food added with different amount of *Carnobacterium* sp. Hg4-03 ( group 1 and group 2) or ddH<sub>2</sub>O ( control). After 14 days and 28 days, 6 larvae from each group were randomly selected to be dissected and contents of guts were collected for bacterial diversity analysis. [ **Results** ] The result showed that bacterial diversity index of treatment groups with Hg4-03 was higher than control group, and the species of bacteria increased. Comparing the bands of DGGE profiles between three groups, the intensity of band stand for *Carnobacterium* sp. Hg4-03 have enhanced. Another band with swelled intensity found in profiles come from treatment group2 after 28 d fed, the sequence analysis showed it belongs to *Bacillus subtilis*. [ **Conclusion** ] Feeding with *Carnobacterium* sp. Hg4-03 could balance the bacteria in larvae gut and increase bacteria diversity, that means the bacteria made a positive effect on the bacterial diversity of *H. gonggaensis* larval gut. Hg4-03 may be used as probiotic bacteria for rearing *H. gonggaensis* larvae in controlling conditions or the larvae's hemi-wild rearing.

**Keywords:** PCR/DGGE; *Hepialus gonggaensis* larvae; *Carnobacterium* sp. Hg4-03; intestinal bacteria; feeding probiotic

( 本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572325)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@sina.com

Received: 20 August 2009/ Revised: 25 September 2009