

不同月份养殖草鱼幼鱼消化道微生物群落动态变化研究

倪加加^{1,2}, 余育和^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了评估草鱼消化道微生物群落结构在草鱼食性转化后的变动情况, 实验对食性转换完成后的草鱼消化道微生物群落结构进行了 PCR-DGGE 分析。结果显示, 不同月份采集草鱼消化道微生物群落结构存在明显差异 (Monte Carlo 检验, A: $F = 3.41$, $P = 0.002$; B: $F = 3.58$, $P = 0.002$), 而被广泛认为影响宿主消化道微生物群落结构的宿主大小、丰满度等因素则在短期内并没有发现会对草鱼消化道微生物群落结构产生影响。实验表明, 短期内环境因素可能是造成草鱼消化道微生物群落结构变动的主要因素。本实验结果将为深入阐述草鱼消化道微生物群落结构的变化规律、消化道益生菌的作用机理、消化道微生物群落结构变动与草鱼疾病的关系等问题积累基础材料。

关键词: 草鱼; 消化道微生物群落; 变性梯度凝胶电泳; 食性转换

中图分类号: Q 938.8; S 965

文献标志码: A

目前已证实消化道微生物在宿主的生长、发育、免疫、健康等方面都起到重要作用^[1-8]。如早在 20 世纪 80 年代 Albert 等^[9]就发现人类小肠内分离的一些微生物种类能够合成维生素 B₁₂; Claus 等^[10]则发现消化道微生物能够通过刺激宿主肝糖原合成和肝脏中甘油三酯的合成来提高小鼠的体质量; 另外, 有学者提出消化道微生物能够将氨水和尿素合成氨基酸来补充反刍动物对氨基酸的需求^[11]。尽管消化道微生物从各个方面影响宿主的生长和健康, 但是这些消化道微生物并不是宿主出生前就存在于其消化道内的, 而是在宿主出生后逐渐进入其消化道并在宿主的健康状况、食物组成、生活环境等因素的影响下最终形成动态平衡的微生物群落结构^[12-16]。如 Muegge 等^[17]通过宏基因组测序技术分析了 33 种不同食性的哺乳动物粪便中的微生物群落, 发现不同食性的哺乳动物粪便中的微生物群落分为截然不同的 3 个类群, 充分证明宿主的食性对其消化道微生物群落结构有明显的影 响; Palmer 等^[18]发现一

周岁以下的婴儿粪便中的细菌群落会随婴儿的生长发生群落结构的演变; 在鱼类方面, Romero 等^[19]则发现银大马哈鱼从受精卵到仔鱼阶段其体内微生物群落结构存在明显的更替。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 作为我国“四大家鱼”之一, 在我国淡水池塘养殖中占据重要地位^[20-21]。草鱼消化道微生物已经得到了大量的研究, 尤其是与纤维素水解相关的微生物^[22-28], 并且近年来已有学者采用分子生物学技术对草鱼消化道微生物群落结构进行了分析, 如 Han 等^[29]和 Wu 等^[21]分别采用构建细菌 16S rDNA 克隆文库和细菌 16S rDNA V1-V3 区高通量测序技术分析了草鱼消化道细菌群落组成并根据其养殖水体、饲料中的细菌群落推断了草鱼消化道细菌的来源; 我们也曾通过 PCR-DGGE 技术比较了池塘饲料养殖草鱼与湖泊野生草鱼消化道微生物群落结构的差异, 并发现生境差异是影响草鱼消化道微生物群落结构的重要因素之一^[16,30]; 另外, 祝东梅^[28]通过对细菌分离培养方

收稿日期: 2013-05-28 修回日期: 2013-08-20

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划 (2009CB118705); 国家自然科学基金项目 (30970358, 31071896)

通信作者: 余育和, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

法研究表明草鱼早期发育阶段其消化道微生物群落结构随其食性的转换而发生变化。

尽管在草鱼消化道微生物方面已有大量研究报告,但是在食性转换完成之后,草鱼的生长和环境变化对其消化道微生物群落结构的影响目前依旧没有得到较为深入的研究,而阐明草鱼消化道微生物群落动态平衡的相对性将为深入阐述草鱼消化道微生物群落结构的变化规律、消化道益生菌的作用机理、消化道微生物群落结构变动与草鱼疾病的关系等问题提供重要的基础材料。因此,我们采用 PCR-DGGE 技术对武汉同一养殖池塘中不同月份采集的草鱼幼鱼消化道微生物群落结构进行了比较,以期阐明各种因素对草鱼消化道微生物群落的影响。

1 材料与方法

1.1 实验样本采集

本实验使用的草鱼于 2009 年 7、8 和 9 月下旬采于湖北省武汉市多福科技农庄 (30°08'N, 114°23'E) 同一养殖池塘,每次分别采集大样本草鱼和小样本草鱼各 8 尾。样本运到实验室称量体长、体质量和全长后立即在无菌条件下解剖取其消化道放入灭菌的 2 mL 离心管中 -20 °C 冷冻保存备用。

1.2 草鱼消化道微生物总 DNA 提取、PCR 扩增及 DGGE 分析

草鱼消化道微生物总 DNA 提取、PCR 扩增及 DGGE 分析参考 Ni 等^[16]方法。

1.3 数据分析

使用 Quantity One 4.6.2 软件 (Bio-Rad, 美国) 识别并生成去泳道背景的 DGGE 凝胶的条带峰值矩阵 (peak matrix of bands)。使用 Canoco for windows 4.5 软件对草鱼消化道微生物群落与草鱼样本的基本生物学数据进行 CCA 排序并结合 Monte Carlo 检验分析它们之间的相关关系。使用 XLSTAT 7.5.2 软件进行 Mantel 检验,其他统计分析则使用 SPSS 13.0 完成。

2 结果

2.1 草鱼样本及 DGGE 指纹图谱基本信息

7 月份采集的草鱼小样本体长和体质量平均为 (5.85 ± 0.964) cm (平均值 ± 标准差) 和 (4.08 ± 0.270) g, 大样本体长和体质量平均为 (11.08 ± 0.481) cm 和 (29.33 ± 3.765) g; 8 月份采集的草鱼小样本体长和体质量平均为 (10.80 ± 0.507) cm 和 (27.28 ± 2.854) g, 大样本体长和体质量平均为 (17.43 ± 0.396) cm 和 (99.83 ± 6.008) g; 9 月份采集的草鱼小样本体长和体质量平均为 (13.46 ± 0.391) cm 和 (47.67 ± 4.065) g, 大样本体长和体质量平均为 (18.80 ± 0.442) cm 和 (131.00 ± 7.783) g (图 1)。除了 7 月份采集的大样本和 8 月份采集的小样本在体长、体质量方面没有显著性差异外,其他各月份样品在体长和体质量方面之间都存在显著性差异 (One-Way ANOVA 结合 Student-Newman-Keuls post hoc 检验, 体长: $F = 135.247$, $P < 0.001$; 体质量: $F = 104.844$, $P < 0.001$)。

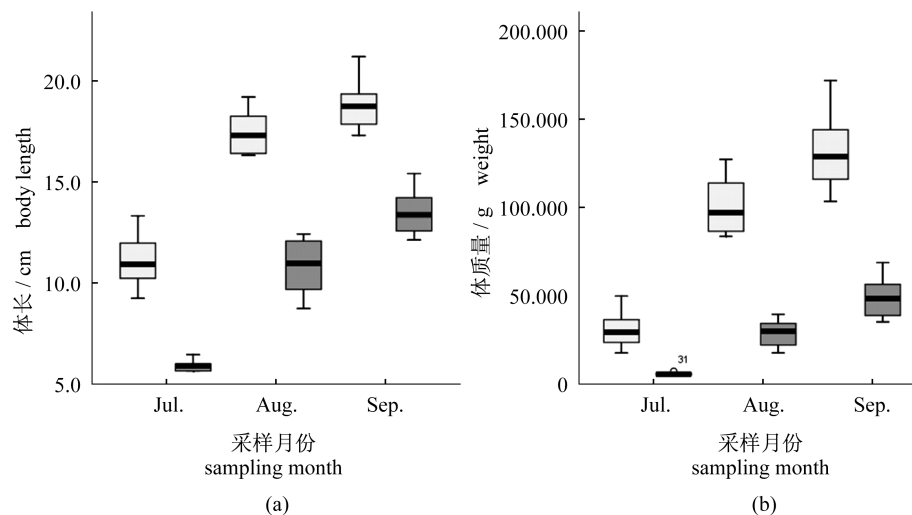


图 1 草鱼样本体长、体质量箱体图

Fig. 1 Box plots of grass carp's body length and weight

本实验进行的两次 DGGE 结果平均得到 DGGE 带型(84.5 ± 1.50)条(平均值 \pm 标准差), 其中共有带型平均(7.5 ± 2.50)条, 仅在一个样

本中出现的特有带型平均(6.0 ± 1.00)条, 每个样品平均得到(41.4 ± 1.05)条 DGGE 条带(图 2)。

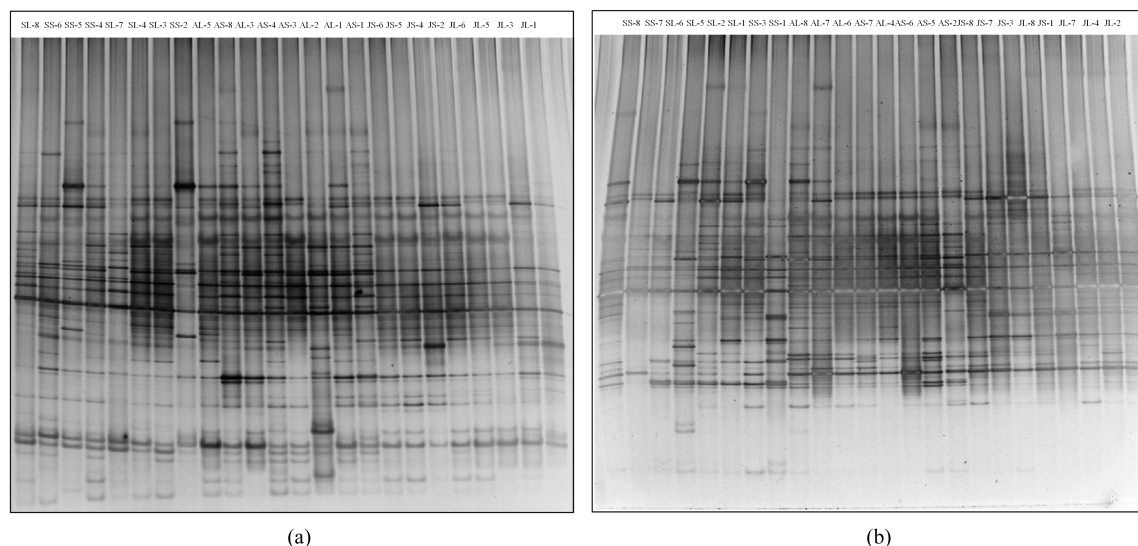


图 2 草鱼幼鱼消化道微生物群落 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 DGGE profiles of gut microbiota from grass carp

2.2 各种因素对草鱼消化道微生物群落结构的影响

CCA 排序结果显示两次 DGGE 结果只有采样月份同时与草鱼消化道微生物群落结构有显著相关(Monte Carlo 检验, $A: F = 1.97, P = 0.012$; $B: F = 1.76, P = 0.010$), 而在第一次 DGGE 结果中同时显示群体差异与草鱼消化道微生物群落结构有显著的相关性(Monte Carlo 检验, $F = 2.73, P = 0.004$), 在第二次 DGGE 结果中显示体质量与草鱼消化道微生物群落结构存在显著的相关性(Monte Carlo 检验, $F = 2.64, P = 0.002$)(图 3)。同时, 结果还显示随着草鱼的生长, 两个群体的草鱼消化道微生物群落结构的差异越来越大(图 3)。Mantel 检验结果也显示草鱼消化道微生物与样本大小(体质量)并不存在显著的相关性, 而与采样月份存在显著相关性(One-tailed, $P < 0.001$)。

3 讨论

消化道微生物与宿主生长的关系因具有特定的生产或疾病预防价值而备受关注。由于草鱼是淡水水体中草食性鱼类的代表物种, 在维持淡水生态系统的平衡和稳定方面起到重要作用, 也正因此, 草鱼被引入到北美和欧洲多国用于水生

植物的生物控制^[31-34]。然而, 同其他脊椎动物一样, 草鱼基因组中并没有表达纤维素水解酶相关的基因, 因此, 推断其对水草中纤维素的消化吸收可能主要借助于其消化道内的微生物来完成^[21]。这使得草鱼消化道微生物备受关注, 并积累了大量的研究^[21-29, 35]。然而, 目前对草鱼消化道微生物的研究主要集中在从草鱼消化道内分离培养与纤维素水解相关的微生物、研究特定条件下草鱼消化道微生物的群落结构, 仅有少量关于草鱼生长及生境差异对草鱼消化道微生物群落结构影响的研究报道^[28, 16]。实验发现食性转换完成以后, 草鱼消化道微生物群落结构会随着不同的月份发生变化, 而且随着草鱼的生长, 不同类群的草鱼消化道微生物群落结构的差异会增加。这暗示将不同来源、不同大小的草鱼进行混养可能会增加整个养殖池塘草鱼消化道微生物群落的 β -多样性。而我们在之前的研究发现相比于湖泊生长的草鱼, 池塘养殖草鱼消化道微生物群落的 β -多样性会明显降低, 并推断这可能是导致池塘养殖草鱼比野生草鱼更容易患病的原因之一^[16]。如果这一假设成立, 那么通过将不同来源、不同大小的草鱼进行混养则可能提高池塘养殖草鱼消化道微生物群落的 β -多样性, 并起到控制草鱼疾病暴发的作用, 但这一推断尚需进一步验证。

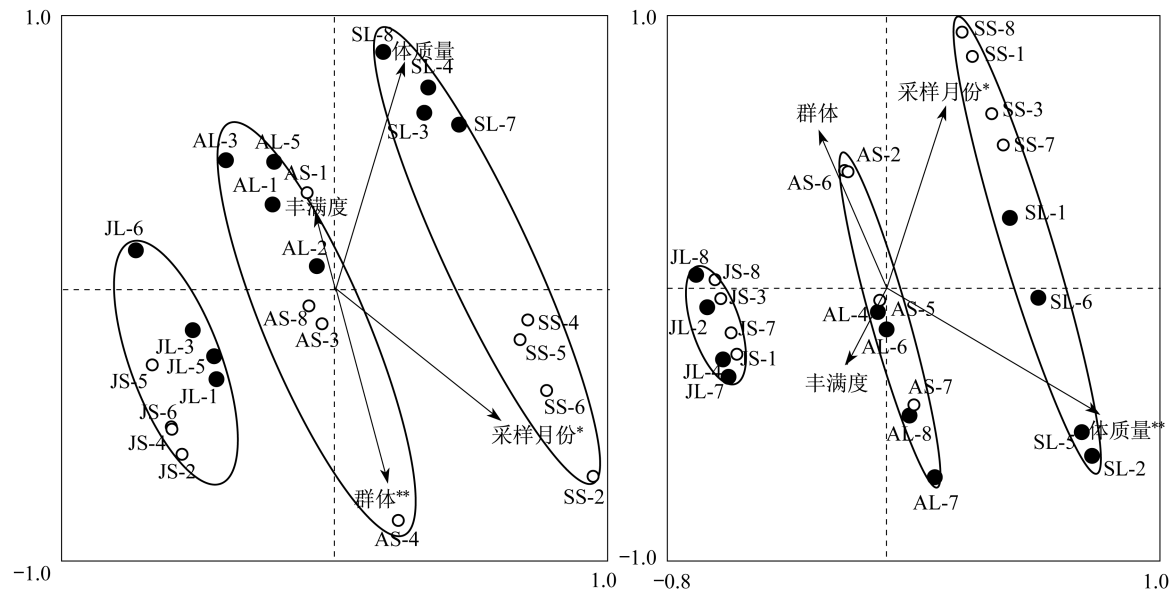


图3 不同大小的草鱼消化道微生物群落结构 CCA 排序图

JL. 7 月份来自于大个体群体的样本; JS. 7 月份来自于小个体群体的样本; AL. 8 月份来自于大个体群体的样本; AS. 8 月份来自小个体样本的群体; SL. 9 月份来自于大个体群体的样本; SS. 9 月份来自于小个体群体的样本。箭头表示外界环境因子, 星号表示显著性水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 3 CCA ordination of gut microbiota of grass carps with different sizes

JL. the samples caught from the larger group in July, 2009; JS. the samples caught from the smaller group in July, 2009; AL. the samples caught from the larger group in August, 2009; AS. the samples caught from the smaller group in August, 2009; SL. the samples caught from the larger group in September, 2009; SS. the samples caught from the smaller group in September, 2009. Factors displayed by arrows with asterisk indicate the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

本实验结果显示,不同的采样月份与草鱼消化道微生物群落结构之间存在显著的相关性,而草鱼的个体大小则只在一次实验结果中检出与草鱼消化道微生物群落结构显著相关,这一结果不仅验证了我们之前发现的生境差异对草鱼消化道微生物群落结构有显著影响^[16],还暗示了即使在相同的生境下,微小的环境差异就可能对草鱼消化道微生物群落结构造成重要的影响,因为不同的采样月份(7、8和9月)意味着草鱼生活的池塘理化因子(水温、pH、透明度、浮游生物量等)存在不同。然而,要确定具体影响草鱼消化道微生物群落结构的环境因素,则需要对草鱼养殖水体的理化因子进行测定,并做更大范围的调查研究。

尽管大量鱼类消化道内益生菌得到分离,并已有许多益生菌应用于水产养殖中^[36-41],然而益生菌的效果与宿主消化道微生物群落结构之间的关系则很少得到关注。我们的结果显示,由于草鱼消化道微生物群落结构随采样月份的不同而发生变化,因此,在评估益生菌作用效果是,必须考虑施用月份和环境不同造成的草鱼消化道内原有

微生物群落结构的差异。

综上所述,草鱼消化道微生物群落结构在草鱼完成食性转换后并不是恒定不变的,不同月份采集的草鱼消化道微生物群落结构有显著差异,这暗示环境因素可能是影响池塘养殖草鱼消化道微生物群落结构的重要因素。

感谢中国科学院水生生物研究所张堂林研究员和多福科技农庄凡家荣经理在采样过程中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Holmes E, Wilson I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431 - 438.
- [2] Bäckhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915 - 1920.
- [3] Dillon R J, Vennard C T, Buckling A, et al. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen

- invasion [J]. Ecology Letters, 2005, 8 (12): 1291 – 1298.
- [4] Mazmanian S K, Lui C H, Tzianabos A O, *et al.* An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system [J]. Cell, 2005, 122(1):107 – 118.
- [5] Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite [J]. Nature, 2007, 450(7169):560 – 565.
- [6] Samuel B S, Shaito A, Motoike T, *et al.* Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(43):16767 – 16772.
- [7] Wang Z, Klipfell E, Bennett B J, *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. Nature, 2011, 472(7341):57 – 63.
- [8] Kinross J M, Darzi A W, Nicholson J K. Gut microbiome-host interactions in health and disease [J]. Genome Medicine, 2011, 3(3):14.
- [9] Albert M J, Mathan V I, Baker S J. Vitamin B₁₂ synthesis by human small intestinal bacteria [J]. Nature, 1980, 283(5749):781 – 782.
- [10] Claus S P, Ellero S L, Berger B, *et al.* Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction [J]. MBio, 2011, 2(2):e00271 – 10.
- [11] Hooper L V, Midtved T, Gordon J I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine [J]. Annual Review of Nutrition, 2002, 22:283 – 307.
- [12] Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, *et al.* Obesity alters gut microbial ecology [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31):11070 – 11075.
- [13] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes [J]. Science, 2008, 320(5883):1647 – 1651.
- [14] Wu G D, Chen J, Hoffmann C, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes [J]. Science, 2011, 334(6052):105 – 108.
- [15] 李学梅, 余育和, 解绶启, 等. 三种室内饲养鱼类肠道微生物群落 PCR-DGGE 指纹分析 [J]. 水生生物学报, 2011, 35(3):423 – 429.
- [16] Ni J J, Yu Y H, Zhang T L, *et al.* Comparison of intestinal bacterial communities in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, from two different habitats [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(5):757 – 765.
- [17] Muegge B D, Kuczynski J, Knights D, *et al.* Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans [J]. Science, 2011, 332(6032):970 – 974.
- [18] Palmer C, Bik E M, DiGiulio D B, *et al.* Development of the human infant intestinal microbiota [J]. PLoS Biology, 2007, 5(7):e177.
- [19] Romero J, Navarrete P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Microbial Ecology, 2006, 51(4):422 – 430.
- [20] 倪达书, 汪建国. 草鱼生物学与疾病 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [21] 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.
- [22] Bairagi A, Ghosh K S, Sen S K, *et al.* Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts [J]. Aquaculture International, 2002, 10(2):109 – 121.
- [23] Saha S, Roy R N, Sen S K, *et al.* Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. Aquaculture Research, 2006, 37(4):380 – 388.
- [24] 雷正玉, 何力, 王朝元, 等. 草鱼体内产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的研究 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(4):54 – 57.
- [25] 冯雪, 吴志新, 祝东梅, 等. 草鱼和银鲫肠道产消化酶细菌的研究 [J]. 淡水渔业, 2008, 38(3):51 – 57.
- [26] 贺刚, 何力, 谢从新, 等. 草鱼肠道一菌株产纤维素酶的分离纯化及性质研究 [J]. 水生态学杂志, 2008, 1(2):107 – 110.
- [27] 黄光祥. 养殖鱼肠道菌群分子生态的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [28] 祝东梅. 草鱼早期发育阶段细菌群落的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [29] Han S F, Liu Y C, Zhou Z G, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences [J]. Aquaculture Research, 2010, 42(1):47 – 56.
- [30] 倪加加. 草鱼消化道微生物群落结构与功能研究

- [D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所,2013.
- [31] Pierce B A. Grass carp status in the United States; a review [J]. *Environmental Management*, 1983, 7 (2):151 – 160.
- [32] Chilton E W, Muoneke M I. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control; a North American perspective [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1992, 2(4):283 – 320.
- [33] Bain M B. Assessing impacts of introduced aquatic species: grass carp in large systems [J]. *Environmental Management*, 1993, 17 (2): 211 – 224.
- [34] Pípalová I. A review of grass carp use for aquatic weed control and its impact on water bodies [J]. *Journal of Aquatic Plant Management*, 2006, 44 (1): 1 – 12.
- [35] He L, Zhang Z, Xie C X, *et al.* Isolation of cellulose-producing microbes from the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2009, 28(1):131 – 135.
- [36] Ringø E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish; a review [J]. *Aquaculture*, 1998, 160 (3 – 4): 177 – 203.
- [37] Sugita H, Okano R, Suzuki Y, *et al.* Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens [J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(5):1004 – 1011.
- [38] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, *et al.* The role of probiotics in aquaculture [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3 – 4):173 – 186.
- [39] Aly S M, Abd-El-Rahman A M, John G, *et al.* Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics [J]. *Aquaculture*, 2008, 277(1 – 2):1 – 6.
- [40] 张信娣, 金叶飞, 陈瑛. 光合细菌对鱼病原细菌生长的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 2008, 16 (3): 659 – 663.
- [41] 刘君, 宋晓玲, 陈志鑫. 益生菌对水产动物的作用研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (9): 78 – 81.

Intestinal microbiota changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in different months

NI Jiajia^{1,2}, YU Yuhe^{1*}

(1. Key Laboratory of Biodiversity and Conservation of Aquatic Organisms, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to assess the changes of the intestinal microbial community after the feeding conversion of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), we analyzed the intestinal microbial communities of grass carp by PCR-DGGE. The results indicated that there were significant differences among the intestinal microbial communities from the grass carps caught in different months. However, the sample size and fullness were not detected to have significant correlation with the intestinal microbial community, which were generally recognized as the factors influencing the intestinal microbial community. These results implied that environmental difference probably is the most important factor influencing the intestinal microbial community in a short-term. Our results will provide the basic information to elucidate the change rule of intestinal microbial community of grass carp, and the action mechanism of the intestinal probiotics, the relationship between intestinal microbes and the fish diseases.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; intestinal microbiota; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); feeding conversion

Corresponding author: YU Yuhe. E-mail: yhyu@ihb.ac.cn