

两种疾病发生对养殖半滑舌鲷肠道菌群结构的影响分析

张 正, 廖梅杰, 李 彬, 王印庚*, 王 岚, 荣小军, 陈贵平

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:为研究疾病发生情况下鱼类肠道菌群的结构变化,运用高通量测序方法分别对感染腹水病和皮肤溃疡病的工厂化养殖半滑舌鲷病鱼及同一养殖系统中健康鱼的肠道菌群结构进行了对比分析。结果发现,养殖半滑舌鲷肠道中的细菌种类要明显少于环境中的细菌种类,仅为养殖池进水和颗粒饲料中细菌种类总数的 14.3%~44.7%。在疾病发生后,病鱼肠道中的细菌种类数量仅是同一养殖系统中健康鱼肠道细菌种类数量的 45.8% 和 64.5%,病鱼肠道中细菌多样性下降非常明显。进一步分析肠道菌群结构的组成发现,虽然发病鱼和健康鱼肠道中超过 60% 的细菌种类不相同,但优势菌群的结构组成差异不明显,丰度最高的前 10 种细菌种类基本相同,其比例超过肠道相对总菌量的 80%。不同疾病的发生对半滑舌鲷肠道菌群结构的影响也不同,腹水病会造成肠道中优势菌株的种类和相对丰度都发生比较明显的改变,而皮肤溃疡病发生前后肠道菌群结构组成几乎没有变化。研究表明,养殖半滑舌鲷的肠道菌群结构相对比较保守,而且并不是所有的疾病种类都会引起肠道菌群结构发生改变。

关键词:半滑舌鲷; 疾病; 肠道菌群; 工厂化养殖; 高通量测序

中图分类号: S 943

文献标志码: A

肠道菌群是动物生命体的有机组成部分,在宿主的消化、吸收、免疫等方面发挥着重要的生理作用。因此,肠道菌群的稳定对于宿主的健康生长意义重大^[1]。近几年来,对人类和动物的肠道菌群研究发现,肠道菌群除参与宿主的生理活动外,其组成结构的变化也与宿主疾病的发生密切相关。在疾病发生前后,不仅宿主肠道的菌群结构会发生明显的改变^[2],而且疾病高发和低发人群的肠道菌群构成也存在着巨大的差异^[3]。因此,对动物或人群的肠道菌群结构进行监测,有可能成为一种评估宿主健康状况的新方法^[4]。鱼类是水产养殖的重要对象,其肠道附生的微生物菌群和生境中的菌群在鱼类健康生长的过程中也发挥着至关重要的作用^[5-6]。由于鱼类所生活的水环境的复杂性,并且鱼类的肠道与水环境直接相通,使得鱼类的肠道菌群结构更容易受到多种因素的影响^[7]。但在高密度集约化养殖的条件

下,水质环境和投喂饵料相对稳定,开展鱼类肠道菌群的研究并掌握这一微生物群落在鱼类不同生理状态下的变化过程和结构差异,有可能为水生动物的疾病监控和预警提供新的思路,并在水产养殖疾病的科学预防和临床治疗方面实现新的技术突破。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)主要分布于太平洋西岸近海水域,是中国海水鲆鲽类养殖的代表品种之一。目前,中国的半滑舌鲷养殖主要以陆基工厂化养殖模式为主,相对简单的水质环境和饲料品种使其成为研究海水鱼类肠道菌群的理想物种。多年的流行病学研究发现,养殖半滑舌鲷的疾病发生是非常普遍的,其中腹水病和皮肤溃疡病是工厂化养殖过程中最为常见的两种疾病类型。这两种疾病具有非常典型的临床病变特征,腹水病的临床症状是内脏腔或消化道中充满大量积液,皮肤溃疡病的临床症状表现

收稿日期:2014-06-09 修回日期:2014-07-02

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD17B03);黄海水产研究所级基本科研业务费专项(20603022013006);天津市农业科技合作项目(201104080)。

通信作者:王印庚,E-mail:wangyg@ysfri.ac.cn

为表皮或鳍组织大面积的溃疡,养成阶段的半滑舌鲷幼鱼和成鱼均可感染这两种疾病而造成大量的死亡。本实验针对这两种疾病,用高通量测序技术对同一养殖系统中发病鱼和健康鱼的肠道菌群结构进行了比较研究,期望从微生态的角度分析疾病发生对养殖鱼类肠道菌群结构变化的影响,也为解析水生动物肠道菌群与宿主健康的相互关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于本次研究的发生腹水病和皮肤溃疡病的半滑舌鲷样品鱼分别取自山东省昌邑市两家不同的养殖厂。这两个养殖厂濒临莱州湾,直线距离约40 km,厂区情况基本相似,每个养殖车间共有半滑舌鲷养殖池24个,日常投喂配合颗粒饲料,养殖池大小为6.5 m×6.5 m,养殖用水为取自地下260 m深井淡水与60 m深井地下卤水勾兑而成,采用流水养殖,每池每日循环量约500%,全年水温18~23℃,盐度17~25。发病时,每池放养300~500 g半滑舌鲷鱼600尾左右,每天早晚各投喂配合颗粒饲料一次。在取样时,两家养殖厂均处于疾病暴发期间,其中皮肤溃疡病发病厂家日死亡量5~10尾/池,腹水病发病厂家日死亡量8~15尾/池。

分别从两家养殖厂发病的养殖池中各捞取3条腹水病和皮肤溃疡病临床症状明显的病鱼,并从同一厂家另外一个未发病的养殖车间中随机捞取同一养殖批次3条活力和摄食均正常的健康鱼作为对照样本鱼,在现场将12条样本鱼分别充氧打包加冰后运回实验室。同时,用无菌采水瓶收集养殖池进水作为待分析水样,用无菌采样袋收集适量颗粒饲料,与样品鱼一同带回实验室进行分析。

1.2 细菌总DNA的提取

在实验室中用冰水混合物浸泡样本鱼30 min待鱼休克后,将鱼置于解剖盘中用70%的酒精棉球擦拭鱼体进行消毒,在无菌条件下将每条样本鱼的消化道从内脏腔中剥离,剪取一部分肠道中段组织放入灭菌的培养皿中,轻轻挤出肠道内容物并用无菌海水滴洗3次后再转入灭菌的离心管中。将3条腹水病病鱼、3条皮肤溃疡病病鱼、取自腹水病发病厂家的3条对照样本鱼和取自皮肤溃疡病发

病厂家的3条对照样本鱼的中肠组织分别混合成一个样本并标记,用组织匀浆机匀浆均匀后,再用OMEGA公司的Soil DNA Kit试剂盒提取肠道组织样本中的细菌总DNA。

用0.22 μm孔径的无菌纤维素滤膜抽滤每个养殖厂养殖池进水水样2 L,然后将滤膜剪碎,用OMEGA公司的Soil DNA Kit试剂盒提取细菌总DNA。颗粒饲料也分别装入无菌离心管并加入少许无菌水用组织匀浆机匀浆均匀后,同样用OMEGA公司的Soil DNA Kit试剂盒提取细菌总DNA。

1.3 高通量测序分析

提取的各样本细菌总DNA,扩增16S rDNA序列的V3可变区,引物序列为5'-ATTACCGC-GGCTGCTGG-3'和3'-CCTACGGGAGGCAGC-AG-5'。扩增每个样本的引物序列前均单独加入长度为8个碱基的不同碱基序列标签,用以标记不同的样本。PCR的反应体系:含15 mmol/L MgCl₂的10×Buffer 10.0 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL,10 μmol/L引物各5 μL,5u/μL *Taq* 酶1.0 μL,DNA模板4.0 μL,灭菌去离子水73 μL,总体积100 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸50 s,连续30个循环;最后72℃延伸10 min。扩增好的DNA序列,经琼脂糖电泳检测阳性后交由国家人类基因组南方研究中心(上海)用PTS-454高通量测序技术进行序列测定和分析。

1.4 数据处理

对获得的测序数据,用MOTHUR软件结合EXCEL软件进行数据统计和分析。数据的统计分析以每个样品中可操作的分类单元(OTU, Operational Taxonomic Unit)作为分类和计算的依据。本实验定义一个OTU为不少于120个有效碱基,且碱基差异小于3%,即序列中碱基差异少于3个的序列群,一个OTU在结果分析中被视为代表一种细菌。

2 结果

2.1 测序结果的质量分析

两家养殖厂所养殖的半滑舌鲷肠道内菌群的OTU数量要明显少于颗粒饲料和养殖池进水中的OTU数量,其中腹水病发病厂家鱼肠道中的OTU数量最高仅为水样中OTU总数的37.9%,

最低为颗粒饲料中 OTU 总数的 14.3%; 皮肤溃疡病发病厂家鱼肠道中的 OTU 数量最高仅为颗粒饲料中 OTU 总数的 44.7%, 最低仅为水样中 OTU 总数的 26.2%。这说明鱼体肠道中的细菌多样性显著低于环境和颗粒饲料中细菌多样性, 环境和颗粒饲料中的细菌对鱼体肠道菌群的细菌多样性影响有限(表 1)。另外, 病鱼肠道中的 OTU 数量相比同一养殖系统中健康鱼肠道中的

OTU 数量显著下降, 腹水病发病鱼肠道中的 OTU 数量仅为健康鱼肠道 OTU 数量的 45.8%, 而皮肤溃疡病中这一数值为 64.5%, 证明疾病的发生对半滑舌鳎肠道中细菌种类的多样性产生了一定程度影响。进一步分析发现, 样品中超过 60% 的 OTU 仅有一条有效序列, 这说明本次实验所采集的半滑舌鳎肠道和环境、颗粒饲料中都存在相对数量较多并占据明显生态优势地位的细菌种类。

表 1 各样品中高通量测序数据统计

Tab. 1 Data statistics for the high-through sequencing technique result in each sample

样品来源 sample	有效序列总数 total numbers of valid sequence in the sample	总 OTU 数 total OTUs in the sample	仅有单一序列的 OTU 数量 the OTUs with unique sequence
腹水病鱼肠道 intestine of diseased fish with ascites	2 321	253	169
腹水对照鱼肠道 healthy fish intestine (control group of ascites)	9 942	552	341
池水进水(腹水) tank inlet water (ascites)	6 064	1 456	876
颗粒饲料(腹水) pellet feed (ascites)	15 210	1 766	968
溃疡病鱼肠道 intestine of diseased fish with skin ulceration	3 374	253	168
溃疡对照鱼肠道 healthy fish intestine (control group of skin ulceration)	6 627	392	258
池水进水(溃疡) tank inlet water (skin ulceration)	2 578	965	638
颗粒饲料(溃疡) pellet feed (skin ulceration)	4 754	876	530

用 MOTHUR 软件中的 rarefaction. single 命令对各样品中测序结果的 OTU 数量对细菌种类多样性的覆盖程度进行分析。根据每个样品中每

次随机抽到的序列数与它们所能代表的 OTU 数量构建稀释性曲线(图 1), 结果发现, 鱼类肠道样品的曲线斜率要明显低于颗粒饲料和池水水样的

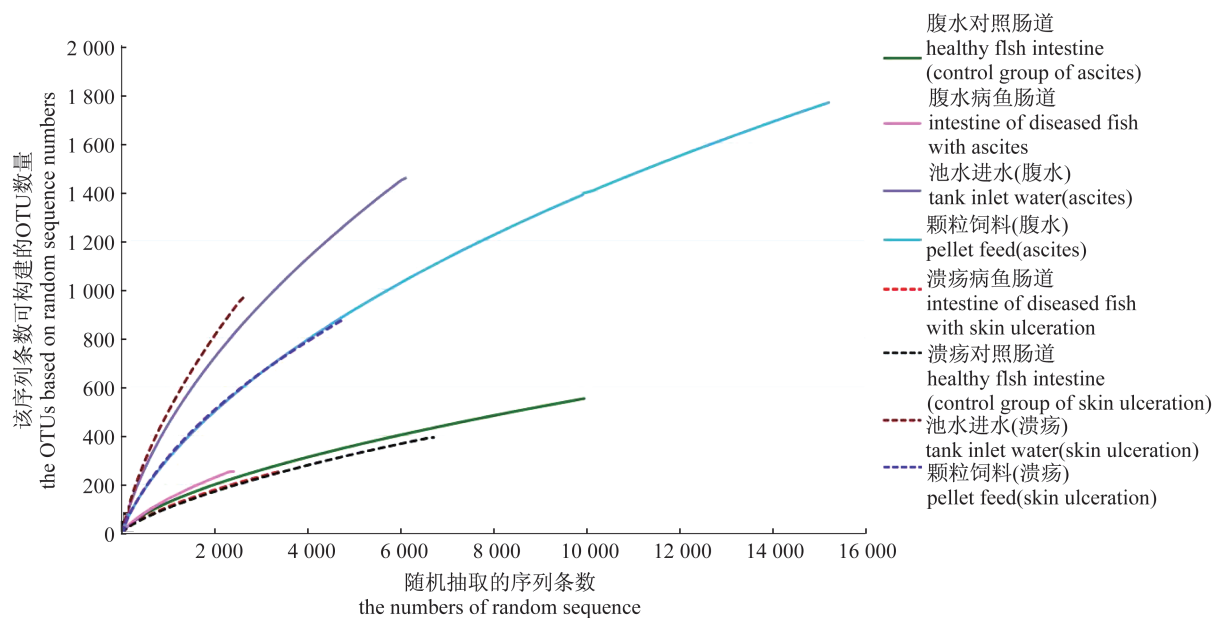


图 1 各样品高通量测序结果的稀释性曲线

Fig. 1 The rarefaction curve of each sample based on high-through sequencing results

曲线斜率,并且逐渐趋于平缓,证明其有效测序数量已经能够较好地覆盖肠道中细菌的多样性。水样和颗粒饲料曲线斜率较大,说明继续增加测序深度有可能发现更多新的 OTU。高通量测序的结果表明,半滑舌鲷肠道中的菌群测序质量要明显优于养殖池水环境和颗粒饲料。

2.2 细菌多样性及相关性分析

以各样品中分布的 OTU 数量及其相对比例作为计算依据,构建了 OTU 的丰度等级分布曲线即 Rank-abundance 曲线(图 2),该曲线在横轴上的长度可以反映样品中细菌多样性的丰富程度,曲线在纵轴上的平坦程度可以反映样品中不同细菌组成的均匀程度。结果表明,本次所采集的实验

样品中,颗粒饲料和池水中的细菌多样性显著高于半滑舌鲷肠道中的细菌多样性。在疾病发生后,病鱼肠道中的细菌种类相比健康的对照鱼也有比较明显的减少。此外,各个样品的曲线在纵轴上都比较陡峭,证实这些样品的菌群结构中都存在相对丰度明显占优的细菌种类,而鱼类肠道中优势细菌的相对丰度比例显然要高于颗粒饲料和水样中优势细菌的相对丰度比例。同时,4 组半滑舌鲷肠道样品的曲线在纵轴上的陡峭程度极为接近,说明优势菌种相对丰度比例在疾病发生前后没有明显的改变。这一现象显示,仅从优势菌种相对比例的定量角度分析,疾病的发生对半滑舌鲷肠道菌群的主体结构特征影响不大。

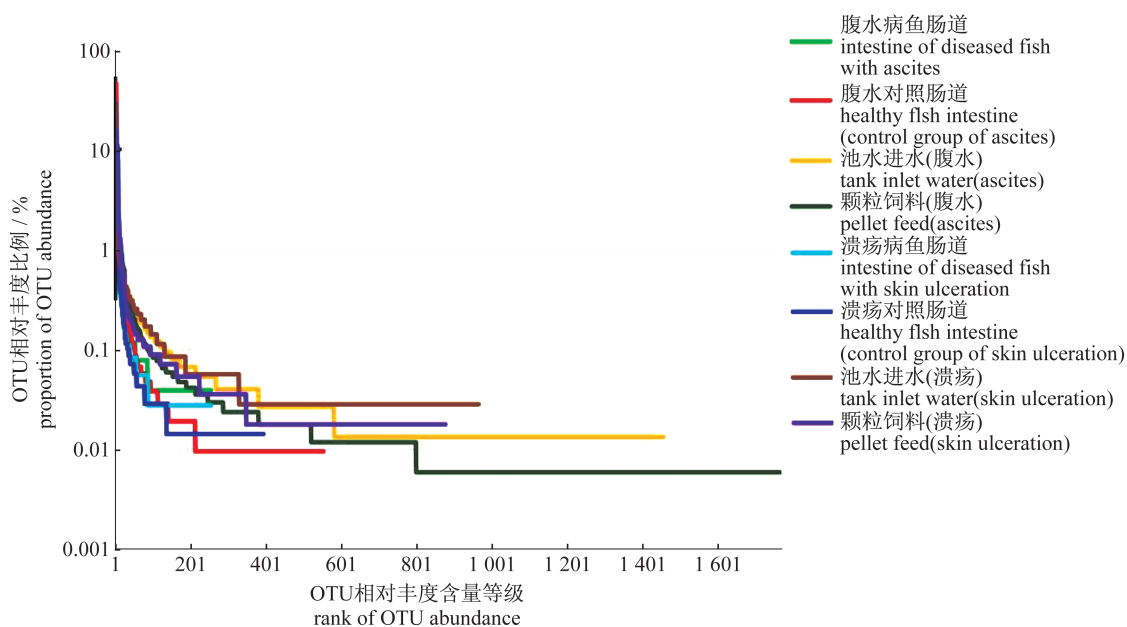


图 2 各样品中细菌多样性的等级分布曲线

Fig. 2 Rank-Abundance curves based on the OTU species number in each sample

进一步分析两家养殖厂各个样品中细菌多样性的相互关系,并构建 VENN 图(图 3)。在两家养殖厂健康鱼肠道中相对比例超过 60% 的 OTU 都是各自肠道中独有的 OTU,这些 OTU 在颗粒饲料和池水水样中没有发现。在疾病发生后,鱼肠道中独有的 OTU 数量所占肠道中总 OTU 数量的比例并没有出现明显的变动。另一方面,腹水病病鱼和健康鱼肠道中共有的 OTU 数量仅占腹水病病鱼肠道总 OTU 数量的 26.9%,占健康鱼肠道总 OTU 数量的 12.3%。在皮肤溃疡病鱼中,两者共有的 OTU 数量仅占溃疡病病鱼肠道总 OTU 数量的 9.9%,占健康鱼肠道总 OTU 数量的 6.4%。以上数据说明,从细菌种类多样性的角度

分析,疾病的发生对半滑舌鲷肠道菌群产生了比较明显的影响,发病鱼和健康鱼肠道中的绝大部分细菌种类是不同的。

2.3 优势 OTU 种类的丰度分析

为进一步确认各个样品菌群结构中的优势菌株及相关性,对各样品中 OTU 相对比例最高的前 10 位进行丰度分析。依据它们在各自样品总 OTU 数量中所占的相对百分比可以发现,无论在半滑舌鲷病鱼还是健康鱼的肠道中都存在着生态优势地位非常明显的细菌菌种(图 4)。在 4 组鱼的肠道样品中,OTU 丰度最高的前 10 种细菌所占的相对比例超过 80%,而颗粒饲料和池水水样中这一比例要低很多。

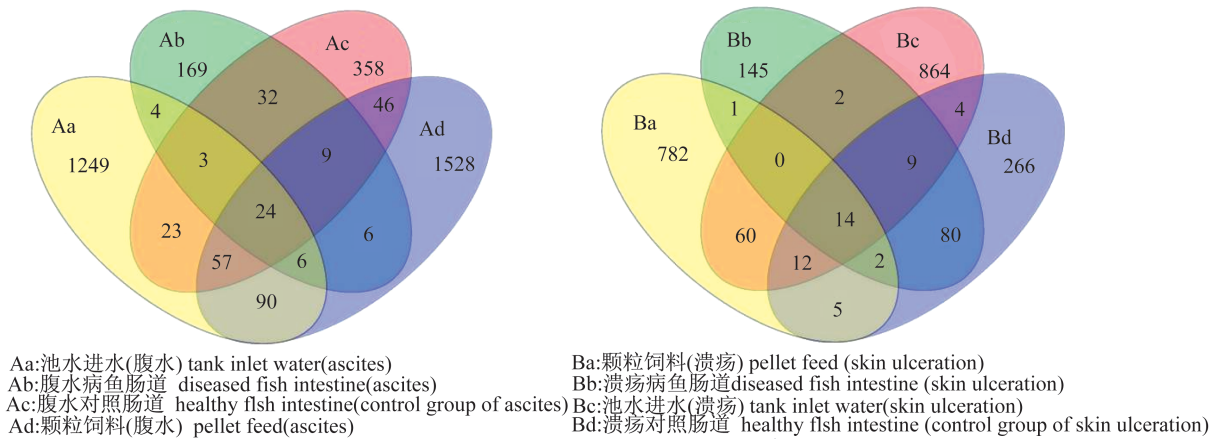


图 3 各样品中细菌多样性的相关性分析

图中数字为各样本中的 OTU 数量

Fig. 3 The similarity analysis of bacteria diversity among different samples

The number in each figure is the OTU amount in different samples

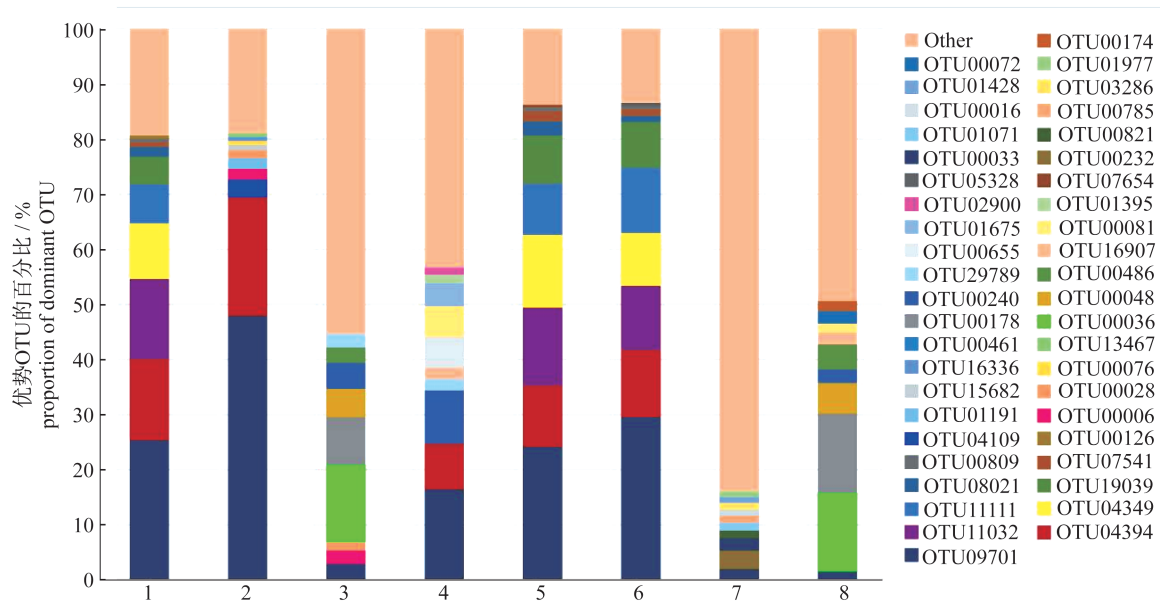


图 4 各样品中优势度最高的前 10 种 OTU 的丰度分析

1. 腹水对照肠道, 2. 腹水病鱼肠道, 3. 池水进水(腹水), 4. 颗粒饲料(腹水), 5. 溃疡病鱼肠道, 6. 溃疡对照肠道, 7. 池水进水(溃疡), 8. 颗粒饲料(溃疡)

Fig. 4 Abundance analysis of the first ten OTUs in each sample

1. healthy flsh intestine (control group of ascites) , 2. diseased fish intestine (ascites) , 3. tank inlet water (ascites) , 4. pellet feed (ascites) , 5. diseased fish intestine(skin ulceration) , 6. healthy flsh intestine(skin ulceration control group) , 7. tank inlet water (skin ulceration) , 8. pellet feed (skin ulceration)

对鱼类肠道中的优势菌群进行分析发现, 皮肤溃疡病发病鱼和健康鱼的肠道菌群结构高度相似, 优势细菌的种类完全相同, 它们的相对比例也非常相近, 说明皮肤溃疡病的发生对半滑舌鲷肠道的菌群结构几乎没有影响。腹水病发病鱼和健

康鱼的肠道菌群结构存在较为明显的差异, 健康鱼肠道中编号为 OTU11032、OTU04349、OTU11111 和 OTU19039 等多种优势细菌在发病后已不再是肠道中的优势细菌, 而编号为 OTU09701 和 OTU04394 的两种优势细菌, 在发

病前后的相对比例也发生了较大幅度的变化。由此可以看出,无论是优势细菌的种类组成,还是相对丰度比例,腹水病的发生都对半滑舌鲷的肠道菌群结构产生了明显的影响。

本实验发病鱼和健康鱼肠道中共有的 OTU 数量比例不高,但可以肯定,这些 OTU 却是肠道中真正的优势菌群,而其他大量存在的 OTU 有可能仅仅是存在于半滑舌鲷肠道中的机会菌群,或许并没有定植于肠道。此外,通过对各个肠道样品中菌群结构进行对比发现,腹水病对照鱼、皮肤溃疡病发病鱼和皮肤溃疡病对照鱼的肠道菌群结构高度相似,而这些鱼却来自两家不同的养殖厂家,这一结果说明,工厂化养殖的半滑舌鲷肠道中应该存在高度保守的菌群结构。

3 讨论

半滑舌鲷已成为支撑我国鲆鲽类养殖产业发展的代表性品种,而腹水病和皮肤溃疡病则是半滑舌鲷养成过程中发生最为频繁两种疾病类型,对养殖的成活率构成了严重的威胁。已有的研究表明,在患腹水病的半滑舌鲷组织中既发现了大量的未知病毒粒子^[8],也分离出了典型的细菌性病原鳃弧菌^[9],而溃疡病则有多种细菌性病原都可以致病^[9-11]。本实验所分析鱼类样品分别采集自两家养殖厂养殖过程中同一批次自然发病和未发病的半滑舌鲷,养殖的水质、饵料等环境因素基本一致,因此可以客观地反映疾病发生对鱼类肠道菌群产生的影响。

相比陆生动物而言,鱼类的肠道与养殖水环境直接相通,其生活的水环境也更为复杂,因此对肠道菌群的影响因素更多^[12-13],这有可能使得鱼类的肠道菌群结构更容易受外界的影响而发生变化。陈孝焯等^[14]研究认为,水环境因子、所摄食的饵料和药物、鱼类自身所处的不同生理状态或发育阶段都会影响肠道菌群结构的组成。本实验中,尽管样品来自不同的养殖厂家并且处于不同的健康状态,但工厂化养殖的半滑舌鲷肠道中仍然存在数量众多的各种 OTU,并且各个样品中大部分的 OTU 彼此之间,以及与养殖池水和颗粒饲料中的 OTU 都没有显示出明显的相关性。通过深入的分析,可以确定绝大部分的 OTU 并不是肠道中的优势细菌。

在对人类和动物的肠道菌群研究过程中发

现,肠道菌群的失衡会导致多种疾病的发生,而疾病的发生也会使肠道菌群结构发生明显的改变^[15-17]。在早期的研究中,通过传统的细菌培养法也发现疾病的发生会造成水产动物肠道中主要的优势菌株组成发生变化^[18-19]。本实验用高通量测序方法分析了两种不同的疾病发生后对半滑舌鲷肠道菌群结构的影响。通过对肠道中的优势菌群进行丰度分析发现,只有腹水病造成了半滑舌鲷肠道优势菌群结构的明显改变,而皮肤溃疡病发病鱼和对照鱼的肠道菌群结构几乎没有差异。从病理学的角度分析,腹水病可以造成半滑舌鲷内脏器官特别是消化道的严重病变^[8],消化道组织的变性坏死对附生其上的微生物菌群影响将会十分显著。溃疡病的病灶主要集中在体表,相对而言对肠道组织的病理影响不甚明显,这可能也是肠道菌群结构几乎无变化的因素之一。

通过对 4 组半滑舌鲷肠道样品中的优势菌群进行丰度分析发现,这些鱼肠道中的优势菌群结构高度相似,并且与养殖池进水和所投喂的颗粒饲料中的菌群无论在菌种组成,还是相对丰度比例上都差异明显。即使腹水病的发生在一定程度上改变了肠道菌群的结构,但病鱼肠道中相对丰度最高的两株细菌仍然是对照鱼肠道中原有的最优势的两株细菌。根据这一现象推测,养殖半滑舌鲷的肠道菌群结构有可能是高度保守的,在工厂化养殖过程中应该不会轻易受到环境因素的影响而发生改变,但需要进一步分析。有学者在对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的肠道菌群研究中有和本实验类似的发现,即野生的鳕鱼在转为人工饲养一段时间后肠道菌群的变化也不明显^[20]。

使用益生菌被认为是水产养殖生产中防控疾病的有效途径之一,益生菌的一个重要功能就是维持宿主肠道微生态的平衡,并协助抵御病原入侵^[21-22]。结合本实验的研究结果进行分析,并不是所有的疾病都会使鱼类的肠道菌群发生明显的改变,因此在使用益生菌时要有的放矢。本实验还发现,养殖半滑舌鲷的肠道中存在着生态优势地位明显的细菌种类,深入研究这些细菌或许可以筛选出适合半滑舌鲷的专属益生菌。

参考文献:

- [1] Sekirov I, Russell S L, Antunes L C, et al. Gut microbiota in health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2010, 90(3): 859-904.

- [2] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9 (5): 313 – 323.
- [3] Niu H, Bao W M, Gong K M, *et al.* The comparative research on intestinal flora population of patients with colorectal cancer and normal people [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2009, 30 (12): 97 – 100. [牛辉, 包维民, 龚昆梅, 等. 大肠癌患者与正常人肠道菌群的比较研究. 昆明医学院学报, 2009, 30(12): 97 – 100.
- [4] Wei H, Dong L, Wang T, *et al.* Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73 (3): 577 – 586.
- [5] Nayak S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41 (11): 1553 – 1573.
- [6] Ganguly S, Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2012, 22(1): 11 – 16.
- [7] Pérez T, Balcázar J L, Ruiz-Zarzuela I, *et al.* Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem [J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3 (4): 355 – 360. .
- [8] Zhang Z, Rong X J, Wang Y G, *et al.* Histopathology of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther with viral ascites [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(3): 287 – 292. [张正, 荣小军, 王印庚, 等. 一种病毒感染引起半滑舌鳎腹水症的病理学观察. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 287 – 292.]
- [9] Chen J. Bacterial diseases and control of tongue fish (*Cynoglossus semilaevis*) in recirculating aquaculture system [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [陈君. 工厂化循环水养殖半滑舌鳎主要细菌性疾病及其控制. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [10] Wang Y, Han Y, Li Y, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. piscicida from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 763 – 768.
- [11] Tang X Q, Zhou L, Zhan W B, *et al.* Isolation and characterization of pathogenic *Listonella anguillarum* of diseased half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) [J]. *Journal Ocean University of China*, 2008, 7(3): 343 – 351.
- [12] Sullam K E, Essinger S D, Lozupone C A, *et al.* Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21: 3363 – 3378.
- [13] Feng J B, Hu C Q. Progress in studies on marine fish symbiotic and epiphytic bacterial communities [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (10): 2722 – 2734. [冯敬宾, 胡超群. 海水鱼类共附生细菌群落研究进展. 生态学报, 2010, 30(10): 2722 – 2734.]
- [14] Chen X X, Wu Z X, Zhou W H. Study on the effects and influencing factors of microflora in the digestive tract of fish [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2005, 24 (5): 523 – 528. [陈孝煊, 吴志新, 周文豪. 鱼类消化道菌群的作用与影响因素研究进展. 华中农业大学学报, 2005, 24 (5): 523 – 528.]
- [15] Wei X, Liu W, Yuan J, *et al.* Research progress on the relationship between human intestinal microbiota and host diseases [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23 (1): 75 – 80. [魏晓, 刘威, 袁静, 等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展. 中国微生态学杂志, 2011, 23 (1): 75 – 80.]
- [16] Wei X, Yang Z, Cui Q, *et al.* Changes of intestinal microbial community and serum inflammatory factors in cirrhosis mice [J]. *Letters in Biotechnology*, 2014, 25(1): 25 – 28. [魏晓, 杨展, 崔茜, 等. 肝硬化小鼠肠道菌群结构及血清炎性因子的变化. 生物技术通讯, 2014, 25(1): 25 – 28.]
- [17] Niu Z X, Zhu R L, Zhang S X. A study on normal microflora in different portions of bowels in the diarrheic and healthy rabbits [J]. *Journal of Shandong Agricultural University*, 1996, 27 (3): 284 – 286. [牛钟相, 朱瑞良, 张绍学. 健康兔与腹泻病兔不同肠段正常菌群研究. 山东农业大学学报, 1996, 27(3): 284 – 286.]
- [18] Li J Q, Tan B P, Mai K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15 (1): 109 – 113. [李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 109 – 113.]
- [19] Gui Y M, Wu Y, Zhu G Q, *et al.* Preliminary research on the therapeutic efficacy of bifidobigen

- complex for *Cyprinus carpio* with fulminant hepatitis [J]. Chinese Journal of Microecology, 1992, 4(2): 47-50. [桂远明, 吴垠, 祝国芹, 等. 复方回春生对鲤暴发性肝炎治疗效果的初步研究报告. 中国微生物生态学杂志, 1992, 4(2): 47-50.]
- [20] Dhanasiri A K, Brunvold L, Brinchmann M F, *et al.* Changes in the intestinal microbiota of wild atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing [J]. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 20-30.
- [21] Wang Y B, Lia J R, Lin J D. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook [J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 1-4.
- [22] José L B, Ignacio D B, Imanol R, *et al.* The role of probiotics in aquaculture [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3-4): 173-186.

Study on cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) intestinal microflora changes affected by different disease occurrence

ZHANG Zheng, LIAO Meijie, LI Bin, WANG Yingeng*, WANG Lan, RONG Xiaojun, CHEN Guiping
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Intestinal microflora play an important role in animal development and health. In order to evaluate the changes of the bacterial communities in fish intestine upon diseases occurrence, the diseased *Cynoglossus semilaevis* cultured in two indoor farms with ascites and skin ulceration, and healthy fish in the same farming system were studied by using high through sequencing technique in this paper. The results revealed that bacteria species in fish intestine were obviously less than those in environment, only accounting for 14.3% - 44.7% of the bacteria species in pellet feed or tank inlet water. After disease occurrence, the bacteria diversity in diseased fish intestine declined markedly, just 45.8% and 64.5% of the bacteria species in healthy fish coming from the same farming system. For further analysis of these microbial communities structure, although more than 60% bacteria species were different between diseased fish and healthy fish, the dominant bacterial communities' structure in these fish intestine had almost no difference. The first ten dominant bacterial strains in each fish sample were basically the same, their total proportion exceeded 80% of the relative bacteria amount in fish intestine. We also found that different disease occurrence had different effects on half-smooth tongue sole intestinal microflora. The microbial community structure in diseased fish intestine with ascites changed distinctly, while the fish with skin ulceration hardly changed. According to the results of this study, the microflora in cultured half-smooth tongue sole intestine was conservative. But not every type of disease can cause this micro-ecosystem structure change.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; disease; intestinal microflora; indoor culture system; high-through sequencing technique

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn