

## 添加外源益生菌对大菱鲆育苗生物饵料菌群结构的影响

于永翔<sup>1,2</sup>, 姜燕<sup>2</sup>, 张正<sup>2\*</sup>, 王印庚<sup>2</sup>,  
景亚运<sup>2</sup>, 廖梅杰<sup>2</sup>, 薛良义<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室,  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为评价在大菱鲆育苗生产中添加外源益生菌对生物饵料轮虫和卤虫微生物菌群结构的影响, 运用基于illumina HiSeq平台的高通量测序技术对添加益生菌和按照生产流程正常强化的轮虫、卤虫进行了菌群结构的分析和对比。添加外源益生菌的实验组轮虫和卤虫中的菌群物种多样性均明显高于对照组。在轮虫强化过程中, 不同时期的对照组样品中菌群结构差异较明显, 优势细菌种类变化较大。而添加外源益生菌后的各时期实验组轮虫菌群结构很相似, 优势菌群的种类更为丰富, *Lactococcus* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.和*Alteromonas* sp.等一直是各实验组中的优势细菌。在卤虫强化过程中, 各对照组样品的菌群结构高度相似, 优势细菌*Cobetia* sp.的相对丰度高达54%~65.2%。而在添加益生菌后, 各实验组中的菌群结构仍高度相似, 但*Cobetia* sp.的比例下降至4.3%~25.3%, 最优势的细菌为*Pseudoalteromonas* sp.和*Alteromonas* sp.等几种, 菌群结构中的物种均匀度更好。研究表明, 在轮虫和卤虫强化过程中添加外源益生菌, 能够改变生物饵料的菌群结构, 使生物饵料中的细菌种类均匀度更好, 并使菌群结构趋于稳定。

**关键词:** 大菱鲆; 生物饵料; 轮虫; 卤虫; 菌群结构; 益生菌

**中图分类号:** S 963.14

**文献标志码:** A

轮虫和卤虫由于适口性佳、繁殖迅速、蛋白营养丰富、对水体污染小等优点, 已被广泛应用于水产养殖的育苗生产中, 成为良好的开口饵料。在实际生产中, 为了提高苗种的成活率及抗逆性, 需要根据不同水产动物苗种的营养需求对轮虫和卤虫进行强化<sup>[1-2]</sup>。一般营养强化包含必需脂肪酸、脂溶性维生素等。利用轮虫和卤虫非选择性滤食的特性, 将这些强化的营养物质填充于轮虫和卤虫体内, 然后再将轮虫和卤虫投喂水产动物幼体, 达到满足幼体对必需脂肪酸的需求<sup>[3]</sup>。

由于活体轮虫和卤虫卵多数采集于自然环境, 采集工艺粗放, 且受环境因素的影响较

大, 因此极易受到污染并携带有害细菌。活体轮虫往往以微生物为食, 体内富集了大量细菌, 如果得不到有效的消毒或灭菌处理, 极有可能被带入养殖系统使幼体发病<sup>[4]</sup>。相关研究证实, 即使在培养的健康轮虫体内也能检测到鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)等水产动物病原菌<sup>[5]</sup>, 在某些特定的条件下气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)的细菌也会大量繁殖<sup>[6]</sup>。卤虫也已经被证实为许多重要病原菌如鳃弧菌的传播载体<sup>[7]</sup>。目前, 在轮虫和卤虫的强化工艺中, 大多通过添加抗生素等化学药物来抑制或杀灭这些病原微生物<sup>[8-9]</sup>。然而在育苗生产中使用大量化学药物, 虽然可以在一定程度上控制

收稿日期: 2016-03-18 修回日期: 2016-10-25

资助项目: 国家自然科学基金(31302206); 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205); 青岛市博士后人员应用研究项目

通信作者: 张正, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

病原菌的传播和蔓延,但也存在很多副作用。如长时间使用抗生素后,会导致养殖系统中细菌耐药性增强,进而产生耐药菌株<sup>[10]</sup>。同时,由于育苗生产过程中,轮虫和卤虫的强化时间都很短,药物在轮虫和卤虫体内难以充分代谢而形成药残,被水产动物幼体摄食后对其组织器官的发育也会产生副作用,并对食品安全形成潜在威胁。药物的大量使用,还干扰了养殖系统中正常微生物菌群的生长和繁殖,破坏微生态平衡,增加了疾病发生的风险<sup>[11]</sup>。

近几年来,因药物过量使用而造成的食品安全问题屡次成为社会关注的热点,而益生菌因其安全、无残留、不产生毒副作用成为水产养殖疾病防控技术的重要研究方向。适宜的微生物制剂不仅能改变养殖系统的微生物区系结构、维持养殖环境及动物体内的微生态平衡,还可以通过分泌特异产物来拮抗病原菌、增强宿主机体免疫力,从而确保养殖动物健康生长。相关研究表明,轮虫、卤虫、桡足类等饵料生物在投喂前用芽孢杆菌等益生菌菌液进行短时间、高浓度的浸泡处理,可以抑制病原菌的增殖<sup>[12]</sup>,提高苗种的生长速率和成活率,减少病害的发生<sup>[13]</sup>。

本研究以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)育苗生产中的开口生物饵料轮虫和卤虫为对象,利用轮虫、卤虫非选择性滤食的特性,通过在生物饵料强化过程中添加外源益生菌,并采集同一强化批次添加益生菌和不添加益生菌的饵料样本,对比分析了它们的菌群结构差异,并借此评估益生菌的添加对生物饵料菌群结构产生的影响,以期为实际生产中优化现有轮虫和卤虫的强化工艺提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 益生菌菌种及菌液制备

实验所用外源益生菌为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),为本实验室从大菱鲆亲鱼肠道中分离,体外抑菌实验显示该菌对鲨鱼弧菌(*V. archariae*)、大菱鲆弧菌(*V. scophthalmi*)和鳗弧菌等病原菌有明显抑制效果。安全实验证实使用该菌按照 $10^9$  cfu/g饲料剂量投喂大菱鲆,通过组织学分析和临床观察,实验鱼无任何病变和死亡发生。该菌在盐度0~35, pH

5~9,温度4~42 °C范围内能较好地生长,属于广温、广盐、酸碱度耐受性较好的细菌<sup>[14]</sup>。

将所选益生菌经胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)琼脂培养基纯培养后,挑取单菌落转移至TSB液体培养基中,120 r/min、30 °C振荡培养18 h至菌液浓度高于 $10^8$  cfu/mL后备用。

### 1.2 生物饵料的强化培养

本次实验时间为2014年12月—2015年1月,在青岛通用水产养殖有限公司大菱鲆育苗车间进行,全程跟踪育苗生产过程中轮虫和卤虫的生产强化工艺,设置添加益生菌的实验组和正常生产的对照组。

该厂轮虫强化工艺为单独批次强化培养轮虫,即购买新鲜轮虫进行强化后当日即投喂完毕。强化工艺为水温( $26 \pm 1$ ) °C,盐度32,纯氧供气确保强化桶中溶解氧浓度不低于5 mg/L。轮虫营养强化剂产自泰国英伟公司,主要成分为DHA和EPA,添加量为50 mL/m<sup>3</sup>水体。同时按10 g/m<sup>3</sup>水体的剂量添加主要成分为维生素B( $\geq 0.6$  g/kg)、维生素C( $\geq 50.0$  g/kg)和维生素E( $\geq 300$  IU/kg)的复合维生素粉,以及20 g/m<sup>3</sup>的抗生素药物,强化时间为8 h。实验组轮虫在强化过程中不使用抗生素,并在强化开始2 h后添加足量益生菌菌液,确保强化桶中益生菌初始浓度 $>10^6$  cfu/mL。对照组按正常生产工艺强化,全程不添加益生菌。强化过程中每隔1 h监测水温、溶解氧和pH值1次。强化完毕后,对实验组和对照组轮虫进行收集,经无菌纱布过滤、无菌海水清洗3次后置于灭菌离心管中放入液氮保存。

卤虫卵为一次性购买、分批使用。每日取适量卤虫卵,完全孵化后即进行倒桶,关闭充氧与加热棒,静置10 min,使死卵和杂质沉于桶底,虹吸出孵化的活卤虫至卤虫收集器,用过滤后的干净海水清洗后转移至强化桶中进行强化。强化工艺为水温( $30 \pm 1$ ) °C,盐度32,纯氧供气确保溶解氧浓度不低于5 mg/L。强化剂主要成分为青岛森森实业有限公司的裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)粉,使用剂量为100 g/m<sup>3</sup>;以及10 g/m<sup>3</sup>水体的复合维生素粉和20 g/m<sup>3</sup>的抗生素药物,强化时间为6 h。与轮虫强化工艺一样,实验组卤虫在强化过程中不添加抗生素,并在开始强化时就添加足量的益生菌菌液,确保强化桶中益生菌初始浓度 $>10^6$  cfu/mL。对照组按正常生产工艺强

化, 全程不添加益生菌。强化过程中每隔1 h监测水温、溶解氧和pH值。强化完毕后, 对实验组和对照组卤虫进行收集, 经无菌纱布过滤、无菌海水清洗3次后放入液氮中保存。

本次实验轮虫取样时间为大菱鲂仔稚鱼的3、7和13日龄, 实验组分别标记为Rot.E3、Rot.E7和Rot.E13; 对照组分别标记为Rot.C3、Rot.C7和Rot.C13。卤虫取样时间为大菱鲂仔稚鱼的13、21和27日龄, 实验组分别标记为Art.E13、Art.E21和Art.E27; 对照组分别标记为Art.C13、Art.C21和Art.C27。

### 1.3 细菌总DNA提取及高通量测序分析

从液氮中取出的轮虫和卤虫样品在无菌操作台中自然解冻后, 称重0.1 g分装至无菌离心管, 加入玻璃珠高速涡旋振荡匀浆后, 用OMEGA公司的Soil DNA Kit试剂盒提取细菌总DNA。将提取的各样本细菌总DNA, 扩增16S rDNA序列的V3-V4可变区, 引物序列为5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'和3'-CCTACGGGAGGCAGCAG-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。经聚合酶链式反应(PCR)及琼脂糖电泳检测阳性后交由北京诺禾致源生物信息科技有限公司基于illumina HiSeq技术测序平台进行高通量测序及分析, 并

对各样品中的有效序列数量进行统计。

### 1.4 数据处理

对获得的序列进行测序, 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, 每个OTU定义为序列相似度高于97%的序列集。并将相关的序列分别提交至NCBI的16S Ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea)数据库中进行BLAST同源性比对和参考分析。

## 2 结果

### 2.1 轮虫和卤虫细菌总量分析

高通量的测序结果显示, 0.1 g轮虫和卤虫样品中, 序列长度为400~430 bp的有效序列数均较高, 为20 000~50 000条, 而OTU数量均少于400个。其中, 轮虫样品中实验组和对照组的有效序列数和OTU数量并没有明显的规律性变化。在卤虫样品中, 与对照组相比, 实验组的有效序列数明显减少, 而OTU数量却显著增加(表1)。

### 2.2 轮虫和卤虫细菌菌群多样性分析

通过对测序数据进行处理分析, 分别选用Shannon、Simpson指数评估轮虫和卤虫中微生物菌群的物种多样性。其中Shannon指数代表样品中的分类总数和每个分类所占的比例, Shannon

表1 不同时期生物饵料样品中的有效序列和OTU数量

Tab. 1 The numbers of valid sequence and total OTUs in the living food

| 样品 samples |                        |         |  | 长度为400~430 bp的有效序列数/个<br>total numbers of valid sequence<br>between 400~430 bp | 样品中有效OTU总数/个<br>total OTUs in the sample |
|------------|------------------------|---------|--|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 轮虫 rotifer | 实验组 experimental group | Rot.E3  |  | 26 438                                                                         | 342                                      |
|            |                        | Rot.E7  |  | 31 116                                                                         | 267                                      |
|            |                        | Rot.E13 |  | 30 419                                                                         | 289                                      |
|            | 对照组 control group      | Rot.C3  |  | 20 277                                                                         | 227                                      |
|            |                        | Rot.C7  |  | 31 550                                                                         | 282                                      |
|            |                        | Rot.C13 |  | 29 190                                                                         | 290                                      |
| 卤虫 artemia | 实验组 experimental group | Art.E13 |  | 36 070                                                                         | 249                                      |
|            |                        | Art.E21 |  | 36 002                                                                         | 373                                      |
|            |                        | Art.E27 |  | 33 748                                                                         | 311                                      |
|            | 对照组 control group      | Art.C13 |  | 46 614                                                                         | 146                                      |
|            |                        | Art.C21 |  | 41 409                                                                         | 279                                      |
|            |                        | Art.C27 |  | 37 462                                                                         | 245                                      |

指数与样品中物种的多样性和物种均匀度成正相关。不同日龄的轮虫和卤虫各实验组Shannon指数为3.4~4.9, 而对照组为2.4~4.3(图1-a); 实验组的微生物菌群多样性和均匀度明显高于对照组。Simpson指数代表群落中的物种数和个体分配均匀度, 其数值变化范围为0~1.0。样品中物种种类越多、个体分配越均匀, 则Simpson指数越高, 群落多样性越好。轮虫和卤虫样品各实验组Simpson指数变化范围为0.78~0.94, 而对照组Simpson指数为0.56~0.90, 但不同日龄的轮虫和卤虫实验组Simpson指数均比对照组高, 说明实验组的菌群多样性要优于对照组(图1-b)。

### 2.3 轮虫和卤虫细菌群落结构的变化

在轮虫和卤虫测序结果中, 对各样品相对丰度大于1%的OTU进行丰度分析, 分别绘制了

轮虫样品(图2)和卤虫样品OTU组成图(图3)。

不同日龄的对照组轮虫样品中OTU结构组成差别明显(图2)。在3日龄对照组轮虫中, 优势度最高的为OTU8、OTU150、OTU254、OTU124和OTU107所代表的5种细菌, 它们的相对丰度之和达到60.2%; 在7日龄对照组轮虫中, 优势度最高的为OTU934、OTU247、OTU8、OTU526和OTU124所代表的5种细菌, 它们的相对丰度之和为64.3%; 在13日龄对照组轮虫中, 优势度最高的为OTU247、OTU254、OTU8、OTU124和OTU934所代表的5种细菌, 它们的相对丰度之和为62.2%。各日龄对照组轮虫中共有的优势细菌物种仅有OTU8所代表的细菌, 样品的菌群结构无规律变化。而实验组中, 3日龄实验组优势度最高的为OTU8、OUT459、OTU340、OTU512、OTU150、OTU170、OTU124和

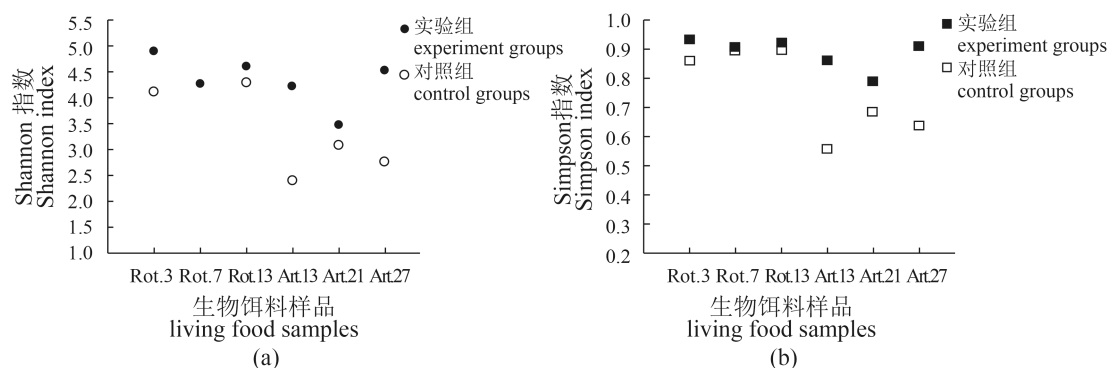


图1 轮虫和卤虫菌群Shannon指数(a)和Simpson指数(b)

Fig. 1 The bacteria Shannon index (a) and Simpson index (b) of rotifer and Artemia

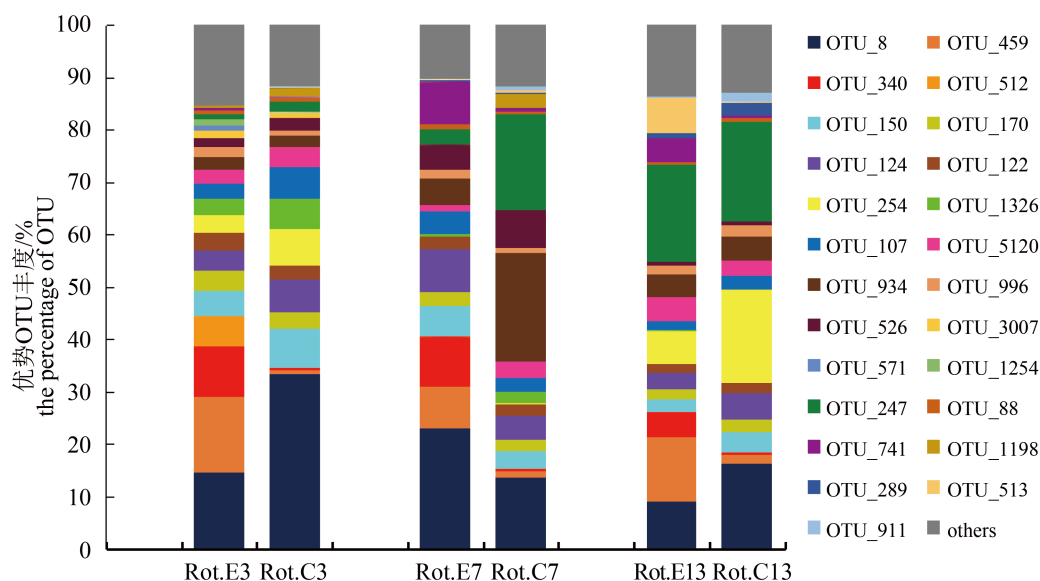


图2 轮虫菌群相似性分析

Fig. 2 The microflora similarity analysis of rotifer

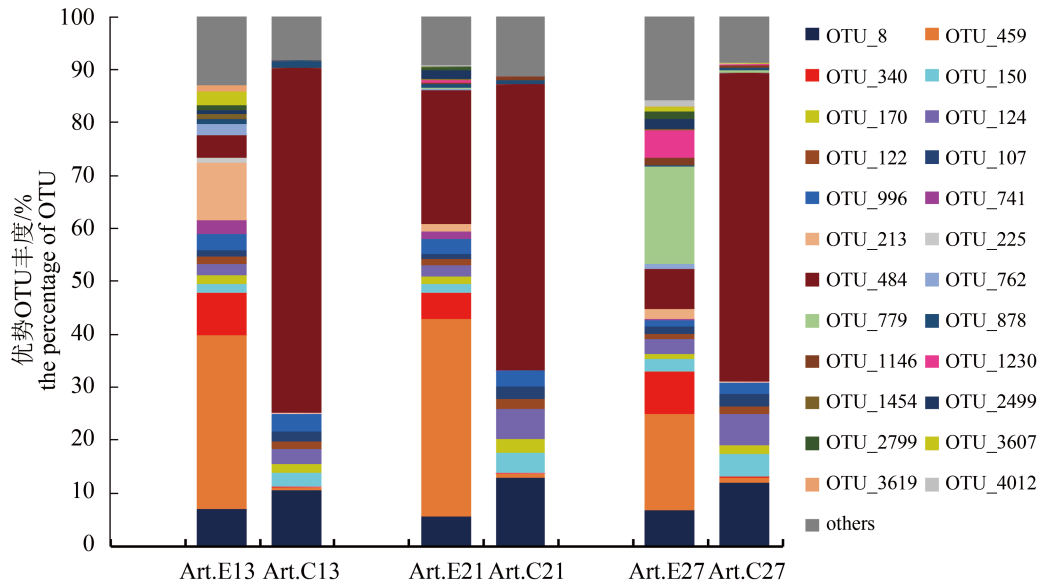


图3 卤虫菌群相似性分析

Fig. 3 The microflora similarity analysis of artemia

OTU122所代表的8种细菌, 它们的相对丰度之和为60.3%; 7日龄实验组轮虫中, 优势度最高的为OTU8、OTU340、OTU124、OTU741、OTU459、OTU150、OTU934和OTU526所代表的8种细菌, 它们的相对丰度之和为59.6%; 13日龄实验组轮虫中, 优势度最高的为OTU247、OTU459、OTU8、OTU513、OTU254、OTU340、OTU741和OTU5120所代表的8种细菌, 它们的相对丰度之和达到66.9%。在实验组轮虫中, OTU8、OTU459和OTU340所代表的3种细菌一直是不同日龄轮虫样品中的优势细菌。

在对照组卤虫中, 13日龄优势度最高的为OTU484、OTU8、OTU996、OTU124和OTU150所代表的5种细菌; 21日龄优势度最高的为OTU484、OTU8、OTU124、OTU150和OTU996所代表的5种细菌; 27日龄优势度最高的为OTU484、OTU8、OTU124、OTU150和OTU107所代表的5种细菌, 它们的相对丰度之和分别为84.6%、79.5%和82.4%(图3)。在所有对照组卤虫中OTU484的相对丰度高达54%~65%, 是样品中占据绝对优势地位的细菌菌种, 其余相同的优势细菌还有OTU8、OTU124和OTU150, 这3种菌的相对丰度之和在各自的样品中分别为16%、22.5%和21.7%, 说明不同日龄的对照组卤虫样品中微生物菌群结构组成极为相似。而在实验组卤虫中, 13日龄优势度最高的为OTU459、OTU213、OTU340、OTU8、OTU484、OTU996和OTU3607所代表的7种细菌, 它们的相对丰度之

和为68.6%; 21日龄优势度最高的为OTU459、OTU484、OTU8、OTU340、OTU996、OTU124和OTU2499所代表的7种细菌, 它们的相对丰度之和为79.8%; 27日龄优势度最高的为OTU779、OTU459、OTU340、OTU484、OTU8、OTU1230和OTU124所代表的7种细菌, 它们的相对丰度之和为67.0%。不同日龄的卤虫实验组菌群结构组成也极为相似, 各实验组共有优势菌有OTU459、OTU340、OTU484和OTU8。在卤虫对照组中占绝对优势的OTU484和OTU8所代表的细菌在实验组中比例显著减少, 两种菌的相对丰度之和分别仅为11.2%、30.8%和14.3%。而OTU459、OTU340所代表的细菌在对照组中相对丰度极低, 但在实验组中相对丰度显著增加, 两种细菌相对丰度之和在实验组卤虫中分别为40.9%、42.3%和26.3%, 实验组和对照组卤虫的菌群结构差异性表现明显。

此外, OTU459、OTU340和OTU8所代表的细菌在轮虫和卤虫的所有实验组中均为优势细菌, 三株菌的相对丰度之和为26.1%~47.8%。实验组轮虫和卤虫的菌群结构相似度较高。

## 2.4 轮虫和卤虫优势菌种的丰度变化

通过对轮虫和卤虫各样品相对丰度最高的前5位OTU进行比对分析, 分别计算它们在各个样品所占的相对丰度, 并将每个样品中优势度最高的前5种OTU的序列提交NCBI的16S Ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea)数

表 2 不同时期轮虫各样品中优势OTU的BLAST比对结果

Tab. 2 The BLAST alignment results of dominant OTUs at different stages of rotifer

| 样品<br>sample | OTU编号<br>OTU no. | OTU丰度/%<br>percentage of<br>OTU | NCBI比对结果<br>the BLAST results in NCBI |                                 | 样品<br>sample | OTU编号<br>OTU no. | OTU丰度/%<br>percentage of<br>OTU | NCBI比对结果<br>the BLAST results in NCBI |                                 |
|--------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
|              |                  |                                 | 相似菌种<br>the closest strain            | 存取号<br>accession no. in<br>NCBI |              |                  |                                 | 相似菌种<br>the closest<br>strain         | 存取号<br>accession no. in<br>NCBI |
| Rot.E3       | OTU8             | 14.5                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     | Rot.C3       | OTU8             | 33.4                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU459           | 14.4                            | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.2                     |              | OTU150           | 7.4                             | <i>Bacillus toyonensis</i>            | NR_121761.1                     |
|              | OTU340           | 9.7                             | <i>Alteromonas mediterranea</i>       | NR_134846.1                     |              | OTU254           | 7.0                             | <i>Salinivibrio proteolyticus</i>     | NR_043536.1                     |
|              | OTU512           | 5.8                             | <i>Geitlerinema</i> sp.*              | NR_102448.1                     |              | OTU124           | 6.5                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
|              | OTU150           | 4.8                             | <i>Bacillus toyonensis</i>            | NR_121761.1                     |              | OTU107           | 6.0                             | <i>Lactococcus lactis</i>             | NR_103918.1                     |
| Rot.E7       | OTU8             | 23.0                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     | Rot.C7       | OTU934           | 21.0                            | <i>Marinomonas ostreistagni</i>       | NR_041352.1                     |
|              | OTU340           | 9.5                             | <i>Alteromonas mediterranea</i>       | NR_134846.1                     |              | OTU247           | 18.1                            | <i>Mesorhizobium ciceri</i> *         | NR_025953.1                     |
|              | OTU124           | 8.1                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |              | OTU8             | 13.6                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU741           | 8.1                             | <i>Vibrio xuii</i>                    | NR_025478.1                     |              | OTU526           | 7.2                             | <i>Tenacibaculum mesophilum</i>       | NR_113841.1                     |
|              | OTU459           | 8.0                             | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.2                     |              | OTU124           | 4.5                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
| Rot.E13      | OTU247           | 18.5                            | <i>Mesorhizobium ciceri</i> *         | NR_025953.1                     | Rot.C13      | OTU247           | 19.0                            | <i>Mesorhizobium ciceri</i> *         | NR_025953.1                     |
|              | OTU459           | 12.4                            | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.2                     |              | OTU254           | 17.7                            | <i>Salinivibrio proteolyticus</i>     | NR_043536.1                     |
|              | OTU8             | 9.0                             | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |              | OTU8             | 16.2                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU513           | 6.8                             | <i>Marinomonas pontica</i>            | NR_042965.1                     |              | OTU124           | 5.0                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
|              | OTU254           | 6.3                             | <i>Salinivibrio proteolyticus</i>     | NR_043536.1                     |              | OTU934           | 4.5                             | <i>Marinomonas ostreistagni</i> *     | NR_041352.1                     |

注: \*.与NCBI已有菌株相似度<97%,下同  
Notes: \*. the similarity (<97%) with the existing strains of NCBI, the same below

数据库中进行BLAST同源性比对(表2, 表3)。选取比对结果中序列相似度>97%的已知菌株序列作为参考菌株进行比对分析。

通过比对发现, 在轮虫样品中, 不同日龄的对照组优势度较高的细菌有*Lactococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Salinivibrio* sp.、*Solibacillus* sp.、*Lactococcus* sp.、*Marinomonas* sp.、*Mesorhizobium* sp.和*Tenacibaculum* sp. 8种, 而在实验组中有*Lactococcus* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.、*Alteromonas* sp.、*Geitlerinema* sp.、*Bacillus* sp.、*Solibacillus* sp.、*Vibrio* sp.、*Mesorhizobium* sp.、*Marinomonas* sp.和*Salinivibrio* sp. 10种细菌。实验组中, 优势细菌的种类发生了比较明显的变化, 并且细菌种类增多。在卤虫样品中, 不同日龄的对照组中优势度较高的细菌包括*Cobetia* sp.、*Lactococcus* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Solibacillus* sp.、*Bacillus* sp.和*Lactococcus* sp.

6种。而实验组相对丰度较高的细菌为*Pseudoalteromonas* sp.、*Sulfitobacter* sp.、*Alteromonas* sp.、*Lactococcus* sp.、*Cobetia* sp., *Pseudomonas* sp.和*Vibrio* sp. 7种。与轮虫样品相似, 卤虫实验组相比对照组, 优势菌种发生了非常明显的变化, 并且优势菌种的数量也有所增加。

3 讨论

生物信息学的不断发展使高通量测序技术的应用领域得到了广泛扩展, 从最开始的毒理药理学研究、临床检测到营养学、微生物耐药性甚至动物产品安全的检测等<sup>[15-17]</sup>。近年来, 基于生物信息学分析的高通量测序技术在水产养殖环境和养殖动物微生物菌群的研究中也得到越来越多的应用<sup>[18-19]</sup>。因为大量不可培养微生物的存在, 经典的细菌培养法在微生物群落结构的研究中越来越受到限制, 往往不能全面反映

表 3 不同时期卤虫各样品中优势OTU的BLAST比对结果

Tab. 3 The BLAST alignment results of dominant OTUs at different stages of Artemia

| 样品<br>sample | OTU编号<br>OTU<br>number | OTU丰度/%<br>percentage<br>of OTU | NCBI比对结果<br>the BLAST results in NCBI |                                 | 样品<br>sample | OTU编号<br>OTU<br>number | OTU丰度/%<br>percentage of<br>OTU | NCBI比对结果<br>the BLAST results in NCBI |                                 |
|--------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
|              |                        |                                 | 相似菌种<br>the closest strain            | 存取号<br>accession no. in<br>NCBI |              |                        |                                 | 相似菌种<br>the closest<br>strain         | 存取号<br>accession no. in<br>NCBI |
| Art.E13      | OTU459                 | 32.9                            | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.1                     | Art.C13      | OTU484                 | 65.2                            | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |
|              | OTU213                 | 10.9                            | <i>Sulfitobacter pontiacus</i>        | NR_026418.1                     |              | OTU8                   | 10.4                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU340                 | 8.0                             | <i>Alteromonas mediterranea</i>       | NR_134846.1                     |              | OTU996                 | 3.5                             | <i>Pseudomonas vranovensis</i>        | NR_043313.1                     |
|              | OTU8                   | 6.9                             | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |              | OTU124                 | 2.9                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
|              | OTU484                 | 4.3                             | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |              | OTU150                 | 2.7                             | <i>Bacillus toyonensis</i>            | NR_121761.1                     |
| Art.E21      | OTU459                 | 37.2                            | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.1                     | Art.C21      | OTU484                 | 54.0                            | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |
|              | OTU484                 | 25.3                            | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |              | OTU8                   | 12.8                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU8                   | 5.5                             | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |              | OTU124                 | 5.8                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
|              | OTU340                 | 5.1                             | <i>Alteromonas mediterranea</i>       | NR_134846.1                     |              | OTU150                 | 4.0                             | <i>Bacillus toyonensis</i>            | NR_121761.1                     |
|              | OTU996                 | 2.7                             | <i>Pseudomonas vranovensis</i>        | NR_043313.1                     |              | OTU996                 | 3.0                             | <i>Pseudomonas vranovensis</i>        | NR_043313.1                     |
| Art.E27      | OTU779                 | 18.3                            | <i>Vibrio vulnificus*</i>             | NR_118570.1                     | Art.C27      | OTU484                 | 58.3                            | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |
|              | OTU459                 | 18.2                            | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | NR_044837.1                     |              | OTU8                   | 11.7                            | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |
|              | OTU340                 | 8.1                             | <i>Alteromonas mediterranea</i>       | NR_134846.1                     |              | OTU124                 | 5.9                             | <i>Solibacillus silvestris</i>        | NR_028865.1                     |
|              | OTU484                 | 7.7                             | <i>Cobetia amphilecti</i>             | NR_113404.1                     |              | OTU150                 | 4.1                             | <i>Bacillus toyonensis</i>            | NR_121761.1                     |
|              | OTU8                   | 6.6                             | <i>Lactococcus piscium</i>            | NR_043739.1                     |              | OTU107                 | 2.4                             | <i>Lactococcus lactis</i>             | NR_103918.1                     |

养殖系统微生物的数量和物种组成<sup>[20]</sup>。而高通量测序技术则有效地弥补了这一缺陷。在以往的水产动物微生物群落的研究中,采用TSB琼脂培养基仅能检测气单胞菌属、假单胞菌属、弧菌属等几类细菌的增殖情况<sup>[21-22]</sup>。而在本研究过程中,通过高通量测序和序列比对分析相结合,检测出了*Salinivibrio* sp.、*Solibacillus* sp.、*Marinomonas* sp.、*Mesorhizobium* sp.、*Tenacibaculum* sp.、*Geitlerinema* sp.、*Marinomonas* sp.、*Cobetia* sp.和*Sulfitobacter* sp.等多属细菌,与传统琼脂平板培养法相比,细菌的物种丰富性显著增加,其结果能更为全面和准确地反映养殖系统的微生物群落结构。

在海水鱼类的育苗生产中,轮虫作为开口生物饵料最初大多采集自天然环境,因而往往携带有大量不同种类的细菌。为保证轮虫强化成活率并杜绝病原菌的传播,传统的轮虫营养

强化工艺中,药物的添加是不可或缺的<sup>[23-24]</sup>。在卤虫的强化过程中,添加适量药物也是为了在高密度培养条件下保护卤虫幼体免受病原菌的感染而造成大量死亡、腐败,确保卤虫的质量和产量<sup>[10, 25]</sup>。但以往的研究也发现,药物的添加会扰乱养殖系统中正常菌群的增殖,最终使养殖动物幼体菌群结构失衡而更易受病原菌的感染<sup>[26]</sup>。因此,寻找适宜益生菌,在轮虫和卤虫强化过程中既可以保证原有微生态菌群结构的平衡,又可以有效抑制病原菌的增殖,成为改良轮虫和卤虫强化工艺的主要技术需求<sup>[27]</sup>。

在本研究中,对照组轮虫的Shannon和Simpson指数比实验组都偏低,证明对照组微生物菌群的菌种多样性和均匀度都低于实验组。这可能是由于抗生素的专一性选择,杀灭或抑制某些对药物敏感的细菌,导致对药物不敏感的细菌失去种间拮抗而达到优势地位。对照组

丰度最高的前5种细菌的相对丰度之和为60%~65%, 而实验组为50%~56%, 表明极优势菌所占的比例有所降低, 因而菌群结构更趋向均衡(表2)。此外, 各对照组轮虫的菌群结构和优势菌种差异明显, 可能是由于各对照组轮虫样品的来源批次和渠道不同而携带了不同的细菌, 尽管后期强化过程中添加了药物, 但丰度最高的几种优势菌仍不相同。与之相比, 实验组轮虫在添加外源性益生菌强化后, 最终的菌群结构相似度很高, 产生这一现象的原因可能是所添加的外源益生菌相比于药物, 其拮抗效果更明显、抗菌谱更广, 从而抑制了更多种类的细菌增殖, 使与益生菌没有明显拮抗作用的细菌有机会成为轮虫体内的优势菌种。实验组中, OTU459所代表的*Pseudoalteromonas* sp.和OTU340所代表的*Alteromonas* sp.可能就是在益生菌抑制了其他大多数细菌的增殖后, 快速繁殖成为优势度较高的细菌。而在卤虫的强化培养中, 这一现象得到了再次验证。由于实验厂家的卤虫卵是同一批次购买, 并且该厂的卤虫强化工艺已经标准化, 环境条件相对稳定, 因此不同日龄对照组卤虫中的菌群结构几乎是一样的, 并且优势菌的相对丰度极高。而添加了益生菌的实验组卤虫, OTU459所代表的*Pseudoalteromonas* sp.和OTU340所代表的*Alteromonas* sp.再次成为各实验组卤虫中的优势菌, 原有的OTU484所代表的*Cobetia* sp.和OTU124所代表的*Solibacillus* sp.相对丰度急剧下降, 说明实验所用的益生菌有可能对它们产生了较好的拮抗作用。通过对轮虫实验组和卤虫实验组的综合分析, 本实验所选用的益生菌可能在轮虫和卤虫的强化系统中发挥了非常明显的拮抗作用。

很多文献研究表明, 弧菌属细菌是轮虫、卤虫强化过程和大菱鲆仔稚鱼培育系统中的常见细菌<sup>[6-7]</sup>, 其在养殖水体中的含量可以高达 $10^5$  cfu/mL以上, 并且大部分弧菌属细菌属于水产养殖动物的病原菌<sup>[22]</sup>。本研究所选用的益生菌, 已通过体外实验证实对弧菌具有非常明显的拮抗作用<sup>[14]</sup>。研究也表明, 实验组轮虫和卤虫的弧菌属细菌含量均较低, 说明在轮虫和卤虫的强化培养过程中添加益生菌能够对弧菌的增殖产生较为明显的抑制作用。Lamari等<sup>[28]</sup>在卤虫无节幼体阶段添加干酪乳杆菌(*L. casei*)可以有效拮抗溶

藻弧菌的繁殖。相关研究证实在轮虫和卤虫幼体中添加几种细菌, 都不同程度地改善了轮虫和卤虫幼体微生态菌群结构, 降低了病原菌的含量。因此, 在轮虫和卤虫强化过程中使用益生菌替代抗生素来抑制病原菌增殖的方法是完全可行的<sup>[10, 29]</sup>。但有文献报道*Pseudoalteromonas*属细菌和*Alteromonas*属细菌也是水产动物的病原菌或条件致病菌<sup>[6, 30-31]</sup>, 而它们在本研究的实验组中却始终处于较高的优势度, 这也说明仅使用一种益生菌无法实现对所有病原菌的拮抗作用, 筛选和运用益生菌组合配方将是未来实际应用中应关注的问题之一。

### 参考文献:

- [1] Gatesoupe F J. Managing the dietary value of *Artemia* for larval turbot, *Scophthalmus maximus*; the effect of enrichment and distribution techniques[J]. Aquacultural Engineering, 1991, 10(2): 111-119.
- [2] Palma J, Bureau D P, Andrade J P. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*[J]. Aquaculture, 2011, 318(3-4): 439-443.
- [3] Immanuel G, Citarasu T, Sivaram V, et al. Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesis in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae[J]. Aquaculture International, 2007, 15(2): 137-152.
- [4] Benavente G P, Gatesoupe F J. Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. Aquacultural Engineering, 1988, 7(4): 289-293.
- [5] Munro P D, Barbour A, Birkbeck T H. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4425-4428.
- [6] Gatesoupe F J. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers[J]. Aquaculture, 1990, 89(2): 139-148.
- [7] Villamil L, Figueras A, Planas M, et al. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with

- bacterial probiotics[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 43-56.
- [8] Tolomei A, Burke C, Crear B, *et al.* Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 357-371.
- [9] Rotman F J, Riche M, Van Wyk P, *et al.* Efficacy of a commercial probiotic relative to oxytetracycline as gram-negative bacterial control agents in a rotifer (*Brachionus plicatilis*) batch culture[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2011, 73(3): 343-349.
- [10] Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, *et al.* The bacterial storage compound poly- $\beta$ -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 445-452.
- [11] Gatesoupe F J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*[J]. *Aquaculture*, 2002, 212(1-4): 347-360.
- [12] Motlagh H R A, Farhangi M, Rafiee G, *et al.* Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. *Aquaculture International*, 2012, 20(4): 693-705.
- [13] Sun Y Z, Yang H L, Huang K P, *et al.* Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae[J]. *Aquaculture*, 2013, 392-395: 44-50.
- [14] 樊瑞峰. 大菱鲈肠道益生菌的筛选及初步应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- Fan R F. Screening of potential probiotics derived from intestine of cultured *Scophthalmus maximus* and preliminary application[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010 (in Chinese).
- [15] Chambers J R, Gong J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens[J]. *Food Research International*, 2012, 44(10): 3149-3159.
- [16] Diaz-Sanchez S, Hanning I, Pendleton S, *et al.* Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(2): 562-572.
- [17] Fang H, Wang H, Cai L, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(2): 1095-1104.
- [18] 张正, 廖梅杰, 李彬, 等. 两种疾病发生对养殖半滑舌鳎肠道菌群结构的影响分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1565-1572.
- Zhang Z, Liao M J, Li B, *et al.* Study on cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) intestinal microflora changes affected by different disease occurrence[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1565-1572 (in Chinese).
- [19] 郑佳佳, 彭丽莎, 张小平, 等. 复合益生菌对草鱼养殖水体水质和菌群结构的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(3): 457-464.
- Zheng J J, Peng L S, Zhang X P, *et al.* Effects of complex probiotics on water quality and microbial communities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 457-464 (in Chinese).
- [20] 王绍祥, 杨洲祥, 孙真, 等. 高通量测序技术在水环境微生物群落多样性中的应用[J]. *化学通报*, 2014, 77(3): 196-203.
- Wang S X, Yang Z X, Sun Z, *et al.* Application of high throughput sequencing in the diversity of water microbial communities[J]. *Chemistry*, 2014, 77(3): 196-203 (in Chinese).
- [21] Planas M, Pérez-Lorenzo M, Hjelm M, *et al.* Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 323-333.
- [22] 史秀清, 张正, 王印庚, 等. 大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 73-82.
- Shi X Q, Zhang Z, Wang Y G, *et al.* The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 73-82 (in Chinese).
- [23] Battaglene S C, Morehead D T, Cobcroft J M, *et al.* Combined effects of feeding enriched rotifers and antibiotic addition on performance of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2006, 251(2-4): 456-471.
- [24] Martínez-Díaz S F, Álvarez-González C A, Legorreta M M, *et al.* Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the

- rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. Aquaculture International, 2003, 11(1): 95-108.
- [25] Asok A, Arshad E, Jasmin C, *et al.* Reducing *Vibrio* load in *Artemia* nauplii using antimicrobial photodynamic therapy: a promising strategy to reduce antibiotic application in shrimp larviculture[J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(1): 59-68.
- [26] Suga K, Tanaka Y, Sakakura Y, *et al.* Axenic culture of *Brachionus plicatilis* using antibiotics[J]. Hydrobiologia, 2011, 662(1): 113-119.
- [27] Avella M A, Gioacchini G, Decamp O, *et al.* Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture[J]. Aquaculture, 2010, 305(1-4): 12-19.
- [28] Lamari F, Sadok K, Bakhrouf A, *et al.* Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia* nauplii[J]. Aquaculture International, 2014, 22(2): 699-709.
- [29] Md S A, Nour A M, Srouf T M, *et al.* Greenwater, marine *Bacillus subtilis* hs1 probiotic and synbiotic enriched artemia and rotifers improved European seabass *Dicentrarchus labrax* larvae early weaning length growth, survival, water and bacteriology quality[J]. American Journal of Life Sciences, 2015, 3(6-1): 45-52.
- [30] Hjelm M, Bergh O, Riaza A, *et al.* Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(3): 360-371.
- [31] Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, *et al.* Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(2): 187-196.

## The microflora changes of rotifer and artemia with probiotics addition in *Scophthalmus maximus* larva breeding

YU Yongxiang<sup>1,2</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>, ZHANG Zheng<sup>2\*</sup>, WANG Yingeng<sup>2</sup>,  
JING Yayun<sup>2</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, XUE Liangyi<sup>1</sup>

(1. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology,

Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Rotifer and artemia are indispensable living food in aquatic larval animal breeding. In order to evaluate bacterial community change in rotifer and artemia enriching process with probiotics adding for turbot larva breeding, their microflora were analyzed using high-through sequencing technique based on illumina HiSeq platform. The results revealed that the diversity of experimental group with probiotics addition was higher than control group, which was the normal process in breeding. During rotifer enrichment process, the bacterial community structures of control group at different time were obviously different, and the dominant bacteria species varied greatly. However, bacterial community structures in different experimental groups were similar, and the dominant bacteria species were more diverse. *Lactococcus* sp., *Pseudoalteromonas* sp. and *Alteromonas* sp. as main bacteria appeared in each experimental group. In artemia enrichment process, bacterial communities of each control group were highly similar. The dominant bacteria of *Cobetia* sp. relative abundance reached 54%–65.2% in control group. With probiotic adding, bacterial community of each experimental group were still highly similar, but *Cobetia* sp. declined to 4.3%–25.3%, *Pseudoalteromonas* sp. and *Alteromonas* sp. became the new dominant bacteria. In conclusion, our findings showed that the bacterial community structure of living food for aquatic animal larva changed obviously and trended to be stable with probiotic adding, and the bacteria species in them became more uniform.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; living food; rotifer; artemia; probiotics; microbial community structure

**Corresponding author:** ZHANG Zheng. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31302206); Shandong Province Independent Innovation and Achievement Transformation Projects (2014ZZCX06205); Qingdao Postdoctoral Personnel Applied Research Projects