

文章编号: 1000-0615(2018)10-1635-13

DOI: 10.11964/jfc.20170910951

尼罗罗非鱼肠道及养殖环境中菌群结构与链球菌病的相关性

刘志刚, 卢迈新*, 可小丽, 王 淼, 张德锋

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为研究尼罗罗非鱼肠道和池塘养殖环境中菌群结构变化与链球菌病暴发的相关性, 实验采用16S *rDNA*高通量测序方法对比分析发病和健康池塘水体、底泥和尼罗罗非鱼肠道菌群的结构特征。结果显示, 底泥中微生物多样性最高, 水体和肠道中微生物多样性次之; 肠道菌群与水体中菌群的相似性较高, 而与底泥中菌群相似性较低; 发病组的尼罗罗非鱼肠道和池塘底泥中微生物的多样性均低于健康组, 而发病组池塘水体中微生物多样性高于健康组。OTU聚类分析发现, 发病与健康尼罗罗非鱼肠道微生物差异极显著, 大部分健康尼罗罗非鱼肠道微生物样品单独聚为一支。菌群结构组成分析结果表明, 虽然发病组和健康组水体或底泥中优势菌群结构组成的差异较小, 但在非优势菌群中存在一定差异, 发病组水体中变形菌门和梭杆菌门的比例显著高于健康组水体, 疣微菌门和浮霉菌门的丰度显著低于健康组水体; 发病组池塘底泥中厌氧粘细菌属、甲烷丝菌属和枝芽孢菌属等具有降解有机质和生态修复功能, 菌群的丰度显著低于健康组底泥, 而具有致病能力的曼氏杆菌属丰度却显著高于健康组底泥。发病组尼罗罗非鱼肠道菌群中链球菌属、分枝杆菌属和曼氏杆菌属等致病菌群的丰度显著高于健康组尼罗罗非鱼肠道, 而乳球菌属、鲸杆菌属和红球菌属等益生菌的丰度显著低于健康尼罗罗非鱼肠道。无乳链球菌普遍存在于发病和健康养殖环境, 以及尼罗罗非鱼肠道中, 无乳链球菌的丰度在发病和健康养殖环境之间无显著差异, 但其在发病尼罗罗非鱼肠道中的丰度要显著高于健康组。研究表明, 尼罗罗非鱼链球菌病发病池塘水体和底泥中有益菌丰度降低和致病菌丰度的升高反映其养殖环境出现恶化, 尼罗罗非鱼链球菌病的暴发与肠道微生态平衡破坏后无乳链球菌丰度增加密切相关, 但肠道中无乳链球菌丰度的剧增与养殖水体和底泥中该病原菌的丰度水平之间并无直接关联。

关键词: 尼罗罗非鱼; 链球菌病; 肠道微生物; 环境微生物; 16S *rDNA*高通量测序

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是一种原产于非洲的热带鱼类, 具有生长快、食性杂、适应性和繁殖力强等特点, 为联合国粮农组织推荐的养殖品种, 也是我国目前出口量最大的淡水鱼类养殖品种^[1-3]。近年来, 随着罗非鱼养殖规模的不断扩大, 养殖环境不断恶化, 链球

菌病在我国罗非鱼主养区大面积暴发流行, 并且发病区域逐年扩大、发病率和死亡率逐年递增, 已成为我国罗非鱼产业健康可持续发展的瓶颈^[2]。无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)目前是我国罗非鱼链球菌病的主要病原菌, 链球菌病的暴发与水温、溶解氧和氨氮浓度等环境因

收稿日期: 2017-09-03 修回日期: 2017-11-19

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 广东省自然科学基金(2016A030313146); 广州市科技计划(201707010312); 广东省鱼病防治专项(20170070000600403)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

子密切相关,其可以通过鱼体间接触传播,也可以通过水体和饲料传播^[2-3]。该病目前尚无完全有效的防治方法,在生产中主要使用抗生素类药物来进行防控,但实际效果并不理想,且抗生素滥用易导致耐药菌株的产生以及药物残留。

研究表明,鱼类肠道菌群组成及其平衡状态与机体健康密切相关,它可通过竞争排斥作用、占位性保护作用、分泌抑菌物质和形成生物膜等多种途径抑制病原的附着与增殖^[4-6]。肠道微生物中的益生菌还具有免疫刺激因子的作用,通过刺激免疫器官发育、促进淋巴细胞免疫功能,进而提高机体的免疫水平,增强机体抗病力^[7]。另外,养殖环境中也存在大量有益微生物类群,它们参与养殖系统的物质循环和水质调节,并直接影响鱼类健康状况^[8-9]。因此,通过微生物制剂来改善罗非鱼肠道和养殖环境中的菌群结构从而预防罗非鱼链球菌病已成为研究的热点。Pirarat等^[10]利用海酸盐微型胶囊包裹鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)投喂罗非鱼,可以改善肠道结构,提高罗非鱼抗无乳链球菌感染能力。Wang等^[11]在罗非鱼养殖水体中泼洒或拌料投喂一株具抗无乳链球菌特性的蜡芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)后均能显著提高鱼体血清非特异性免疫指标,并改善罗非鱼肠道菌群结构,从而提高其抗链球菌病能力。为了科学有效地利用益生菌对罗非鱼肠道和养殖环境中微生物结构进行定向改良,研究链球菌病发病以及健康的罗非鱼肠道和养殖环境中微生物菌群结构特征具有重要理论意义。

自然界中绝大多数的细菌都不能在实验室条件下培养,传统的分离培养方法无法全面反映环境中菌群的结构组成^[12]。以细菌16S *rDNA*基因分析为基础的常规分子生物学方法,包括变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)、单链构象多态性分析(SSCP)和第一代测序技术(Sanger法)等虽然克服了分离培养的局限,但也只能检测优势菌群的组成和变化情况^[13]。新一代的高通量测序技术具有高灵敏度和高通量的特点,能够定性和定量分析包括低丰度和不可培养菌群在内的微生物多样性和丰度,且可信度高^[14]。本实验通过16S *rDNA*高通量测序法分析链球菌发病以及健康的尼罗罗非鱼肠道、池塘水体和底泥中微生物群

落结构组成特点,通过对比分析其差异来揭示链球菌病暴发与尼罗罗非鱼肠道及环境微生态环境变化之间的相关性,为构建尼罗罗非鱼链球菌病的微生态防控技术以及筛选链球菌病早期预警标志微生物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用样品于2015年7月采集于广州增城区某罗非鱼养殖场,该养殖场部分池塘出现尼罗罗非鱼大量死亡现象,经病原菌分离鉴定确认为无乳链球菌。采集5个发病池塘和5个健康池塘的水体(S1~S5; cS1~cS5)和底泥(N1~N5; cN1~cN5)样品;采集3个发病池塘中的发病尼罗罗非鱼肠道内容物(C1~C3)和3个健康池塘中健康尼罗罗非鱼的肠道内容物(cC1~cC3)。采样时池塘水温为(29.0±1.0) °C, pH为7.5±0.5,溶解氧为(5.6±0.7) mg/L,利用采水器采集70~100 cm处的中层水(500 mL),利用柱状采泥器采集1~5 cm的池塘表层底泥(100 mL),每个池塘均采用5点采样法采集水体和底泥样品,混合后置于无菌采样瓶中。肠道内容物的采集方法为从每个发病鱼塘中采集3尾具链球菌病典型症状(体色发黑,眼球突出或浑浊发白,在水面打转或间歇性窜游、胆囊肿大、肠壁充血、肠道内容物稀薄或积水)的病鱼,从每个健康鱼塘采集3尾健康尼罗罗非鱼,鱼体规格为(56.0±4.5) g,将上述尼罗罗非鱼无菌解剖后分别从脑、肝和肾脏组织中接种分离细菌,并剪取肠道组织装入无菌离心管中。健康鱼各组织中均未分离到细菌,病鱼各组织中均能分离到较纯的细菌,16S *rDNA*基因测序分析和生化鉴定结果均显示为无乳链球菌,采用5×10⁸ CFU/mL的无乳链球菌人工回归感染尼罗罗非鱼能够复制出自然发病尼罗罗非鱼的典型症状,且能够再次分离出无乳链球菌,由此可确诊上述发病鱼患链球菌病,而健康鱼未感染无乳链球菌。用无菌剪刀将肠道组织剪开,用解剖刀轻轻刮取内容物,采自同一池塘的3条鱼的肠道内容物混匀成一个样品。

1.2 细菌基因组DNA提取

取100 mL池塘水体,采用装有0.22 μm微孔

滤膜的真空抽滤装置进行抽滤, 取出滤膜, 剪碎后采用water DNA kit (Omega)提取细菌基因组DNA。取0.3~0.5 g底泥样品, 采用soil DNA kit (Omega)提取细菌基因组DNA。取0.3~0.5 g肠道内容物样品, 采用stool DNA kit (Omega)试剂盒提取细菌基因组DNA。最后采用1%琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪检测所抽提DNA的质量和浓度。

1.3 16S *rDNA*高通量测序

样品DNA检测合格后, 用带标记的特异引物扩增16S *rDNA*的V3+V4区。引物序列为341F: CCTAYGGGRBGCASCAG和806R: GGACTACNNGGGTATCTAAT。然后切胶回收PCR扩增产物, 采用QuantiFluor™荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合, 连接测序接头, 构建测序文库, Hiseq 2500 PE 250上机测序。高通量测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

1.4 数据分析

对样品的V3+V4区域的PCR产物进行测序后并拼接成tag, 利用Mothur软件对测序序列进行去冗余处理, 使用基于Naive Bayesian方法的分类器rdp classifier工具对tag进行物种注释。利用Mothur软件计算97%相似度下的OTU数量, 并采用众数原则对OTU进行物种注释。采用Mothur软件进行样品的 α 多样性分析, 绘制OTU稀释曲线和Rank abundance曲线。采用R软件进行样品 β 多样性分析、聚类分析和维恩图的绘制。采用SPSS 19.0软件中的单因素方差分析方法进行多样本的显著性差异分析($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 样品测序质量分析

该实验中尼罗罗非鱼肠道、池塘养殖水体和底泥微生物样品高通量测序获得的有效序列较多, 为41 665~91 091条, 平均为75 717条; 利用Mothur计算0.03距离下各样品的OTU数量, 为8 691~33 198个, 平均为18 012个, 说明各样品的微生物丰富度较高。利用测得序列中已知的OTU相对比例与其相对应的OTU数量的期望值构建稀释曲线, 结果显示, 各样品曲线都趋于平缓, 说明测序深度能够基本覆盖样品中所有物种(图1)。

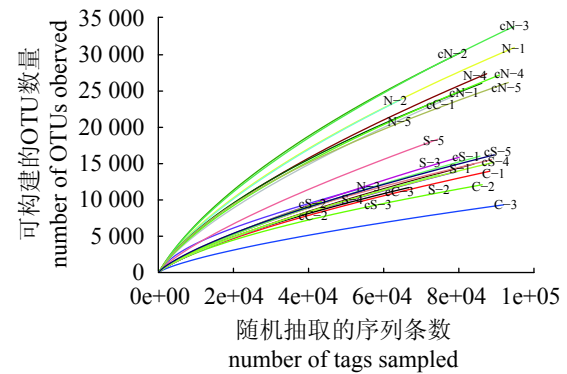


图1 水体、底泥和肠道菌群的OTU稀释曲线图

S1~S5为发病池塘水体菌群; cS1~cS5为健康池塘水体菌群; N1~N5为发病池塘底泥菌群; cN1~cN5为健康池塘底泥菌群; C1~C3为发病尼罗罗非鱼肠道菌群; cC1~cC3为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 1 The OTU rarefaction curves of microflora in water, sediment and intestinal tract

S1~S5 stand for the water microflora of diseased pond; cS1~cS5 stand for the water microflora of healthy pond; N1~N5 stand for the sediment microflora of diseased pond; cN1~cN5 stand for the sediment microflora of healthy pond; C1~C3 stand for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC1~cC3 stand for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

2.2 发病组与健康组微生物多样性的差异和聚类分析

测序结果显示, 底泥样品的OTU数>水体样品的OTU数>肠道内容物样品的OTU数, 说明底泥微生物的丰富度最高(表1)。比较样品的 α 多样性指数可知, 发病池塘水体(S组)的Chao1值、ACE值和Shannon指数均大于健康池塘水体(cS组), Simpson指数则小于cS组, 而在底泥和肠道内容物微生物样本中正好相反, 说明无乳链球菌暴发后尼罗罗非鱼肠道和池塘底泥中的微生物多样性降低, 而水体中微生物多样性升高(表1)。将样品中的OTUs按相对丰度由大到小排序得到对应的排序编号, 再以OTUs的排序编号及其相对丰度绘制得到Rank Abundance曲线(图2)。底泥样品的曲线在横轴上的跨度最大, 同样说明其微生物丰富度最高。各个样品的曲线在纵轴上都比较陡峭, 说明这些样品均存在相对丰度明显占优势的细菌种类; 发病组样品的曲线大多数比健康组的样品曲线更为陡峭, 说明健康组样品中菌群的均匀度更高。

对各组样品中不同生物学重复样品的OTU取交集, 然后分析不同组之间的共有及其特有

表1 肠道、水体和底泥微生物的 α 多样性分析Tab. 1 The α diversity of microflora in water, sediment and intestinal tract

样品名称 samples	有效序列数 number of sequences	运算分类单元 OTUs	Chao1值 Chao1	ACE值 ACE	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson
S	71 517.80±11 398.32 ^a	14 531.40±2 566.27 ^a	55 525.82±10 397.68 ^a	115 351.74±20 130.46 ^a	6.50±0.70 ^a	0.02±0.02 ^a
cS	73 500.60±18 711.63 ^a	13 815.80±2 619.42 ^a	50 011.19±8 228.53 ^b	101 277.68±17 026.30 ^a	6.29±0.50 ^a	0.03±0.03 ^a
N	73 324.80±15 228.47 ^a	23 180.60±7 035.22 ^b	73 065.50±17 313.35 ^c	129 146.21±30 792.78 ^a	8.75±0.47 ^c	0.00±0.00 ^a
cN	85 726.00±5 336.55 ^a	28 161.60±3 308.29 ^b	79 683.42±9 521.53 ^c	131 604.35±23 906.65 ^a	9.14±0.31 ^c	0.00±0.00 ^a
C	85 311.33±2 782.72 ^a	11 512.33±2 279.72 ^a	35 861.07±7 006.67 ^b	64 325.95±14 550.11 ^b	5.39±1.02 ^b	0.09±0.10 ^b
cC	64 119.33±21 108.58 ^a	11 775.33±3 267.82 ^a	35 700.98±8 213.92 ^b	64 346.72±14 609.95 ^b	6.41±0.20 ^a	0.02±0.00 ^a

注：数值为mean±SD；各列数字上方字母不同表示组间差异显著， $P<0.05$ ；字母相同表示组间无显著差异， $P>0.05$ ；S为发病池塘水体菌群；cS为健康池塘水体菌群；N为发病池塘底泥菌群；cN为健康池塘底泥菌群；C为发病尼罗罗非鱼肠道菌群；cC为健康尼罗罗非鱼肠道菌群
Notes: values in the table show in the form of mean±SD; the different letters above the numbers represent significant difference, $P<0.05$; the same letter above the numbers represent no significant difference, $P>0.05$; S stands for the water microflora of diseased pond; cS stands for the water microflora of healthy pond; N stands for the sediment microflora of diseased pond; cN stands for the sediment microflora of healthy pond; C stands for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC stands for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

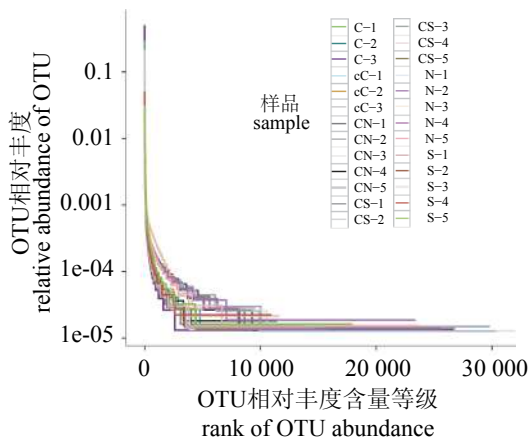


图2 肠道、水体和底泥微生物的 Rank Abundance 曲线图

S1~S5为发病池塘水体菌群；cS1~cS5为健康池塘水体菌群；N1~N5为发病池塘底泥菌群；cN1~cN5为健康池塘底泥菌群；C1~C3为发病尼罗罗非鱼肠道菌群；cC1~cC3为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 2 The rank abundance curves of microflora in water, sediment and intestinal tract

S1~S5 stand for the water microflora of diseased pond; cS1~cS5 stand for the water microflora of healthy pond; N1~N5 stand for the sediment microflora of diseased pond; cN1~cN5 stand for the sediment microflora of healthy pond; C1~C3 stand for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC1~cC3 stand for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

OTU，绘制维恩图(图3)。结果表明，发病组肠道和底泥中OTU数均低于相应健康组，而发病组水体中OTU数高于健康组水体。尼罗罗非鱼肠道、池塘水体和底泥微生物之间存在一定差异，共有OTU仅占各自OTU总数的38%~48%。尼

罗罗非鱼肠道与水体的共有OTU及其与底泥的共有OTU在肠道微生物中所占比例分别为7.45%~9.44%和4.00%~4.92%，肠道微生物与水体微生物的相似性高于其与底泥微生物的相似性。

根据各样品微生物OTU的表达谱，计算样品间距离，并对样品进行聚类分析，以判断在OTU水平上各样品的相似性。结果显示，水体微生物样品与肠道微生物样品聚为一大支，而底泥中微生物样品独立聚为一支，说明肠道微生物与水体微生物的相似性较高，与底泥中微生物相似性较低。发病组与健康组的水体微生物和底泥微生物样本均未能分别聚为一支，说明链球菌病暴发后水体和底泥中微生物的变化并不显著；但发病尼罗罗非鱼与健康尼罗罗非鱼肠道微生物差异较大，绝大多数健康尼罗罗非鱼肠道微生物样品单独聚为一支(图4)。

2.3 发病组与健康组微生物群落组成的差异

水体、底泥和肠道菌群在门水平上的差异池塘水体、底泥和尼罗罗非鱼肠道中微生物群落主要可以归类为16个门，健康池塘水体(cS组)中丰度排在前三名的优势菌群门类为放线菌门(Actinobacteria, 36.59%)、变形菌门(Proteobacteria, 28.57%)和疣微菌门(Verrucomicrobia, 6.74%)；发病池塘水体(S组)中的优势菌群门类为变形菌门(37.00%)、放线菌门(32.07%)和蓝细菌门(Cyanobacteria, 5.81%)。cS与S组优势菌群的门类组成基本一致，其中放线菌门和变形菌门所占比

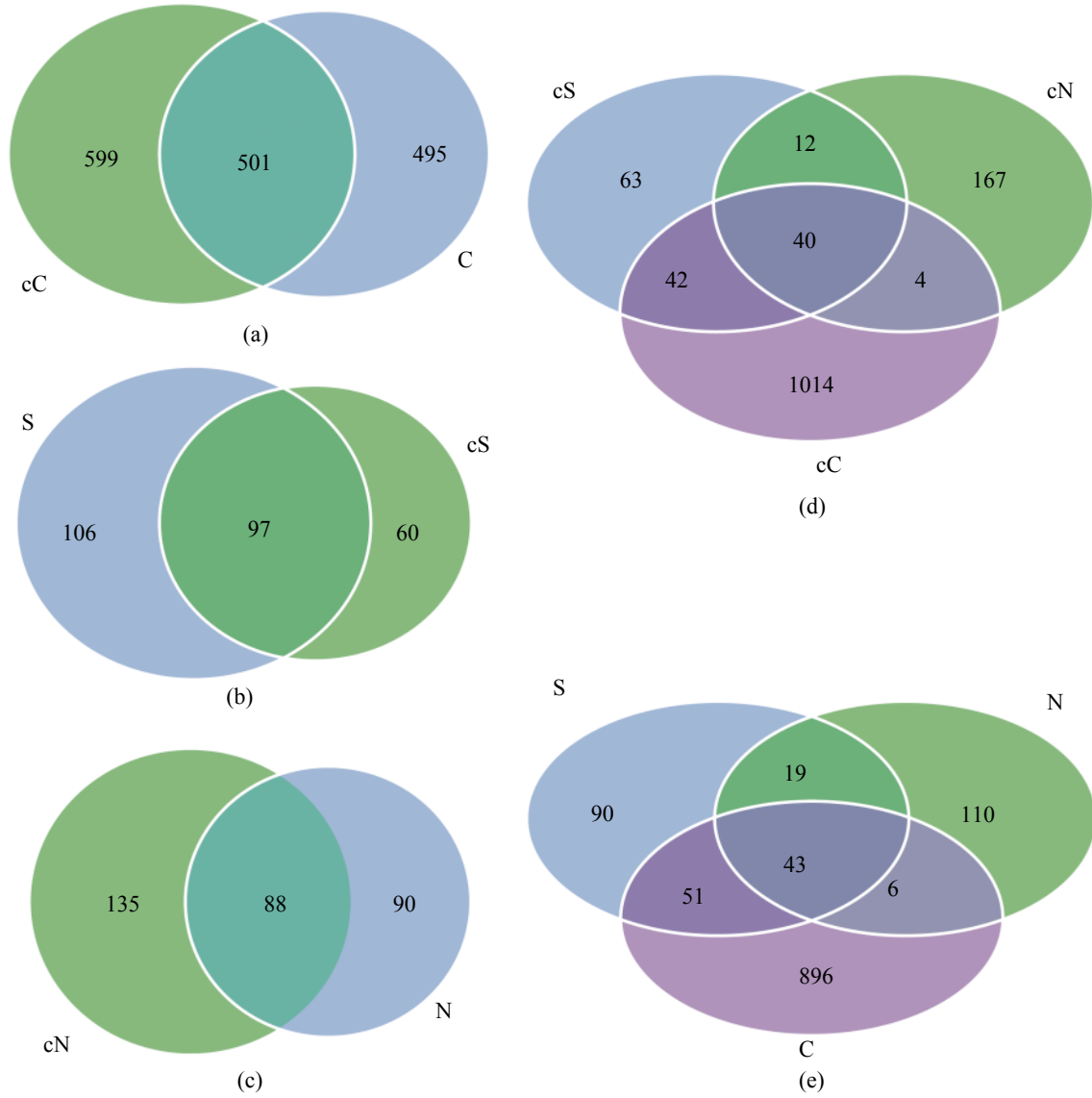


图 3 肠道、水体和底泥微生物OTU的维恩图

图中数字为各组样本中OTU的数量; (a)发病和健康尼罗罗非鱼肠道菌群; (b)发病和健康池塘水体菌群; (c)发病和健康池塘底泥菌群; (d)发病池塘水体和底泥菌群以及发病尼罗罗非鱼肠道菌群; (e)健康池塘水体和底泥菌群以及健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 3 Venn diagrams of the OTU of microflora in water, sediment and intestinal tract

The numbers in figures represent the OTU number in different samples; (a) the Venn diagram of intestinal microflora in diseased *O. niloticus* and healthy *O. niloticus*; (b) the Venn diagram of water microflora in diseased pond and healthy pond; (c) the Venn diagram of sediment microflora in diseased pond and healthy pond; (d) the Venn diagram of water microflora, sediment microflora in diseased pond and intestinal microflora in diseased *O. niloticus*; (e) the Venn diagram of water microflora, sediment microflora in healthy pond and intestinal microflora in healthy *O. niloticus*

例在两组中都达到65%以上。另外, S组中变形菌门和梭杆菌门(Fusobacteria)的比例显著高于cS组, 而疣微菌门和浮霉菌门(Planctomycetes)的丰度显著低于cS组(图5)。

健康池塘底泥(cN组)中位于前三的优势菌群门类为变形菌门(36.68%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 8.85%)和绿弯菌门(Chloroflexi, 8.14%)。发病池塘底泥(N组)中的优势菌群门类组成与cN组完

全一致, 两组中均为变形菌门所占比例最大, 各门类的丰度之间差异较小。

健康尼罗罗非鱼肠道(cC组)中位于前三的优势菌群门类为厚壁菌门(Firmicutes, 45.07%)、变形菌门(17.17%)和浮霉菌门(8.98%); 发病尼罗罗非鱼肠道(C组)中优势菌群门类为厚壁菌门(50.62%)、放线菌门(16.27%)和浮霉菌门(12.43%)。C组和cC组的优势菌群门类组成基本一致, 均为厚壁

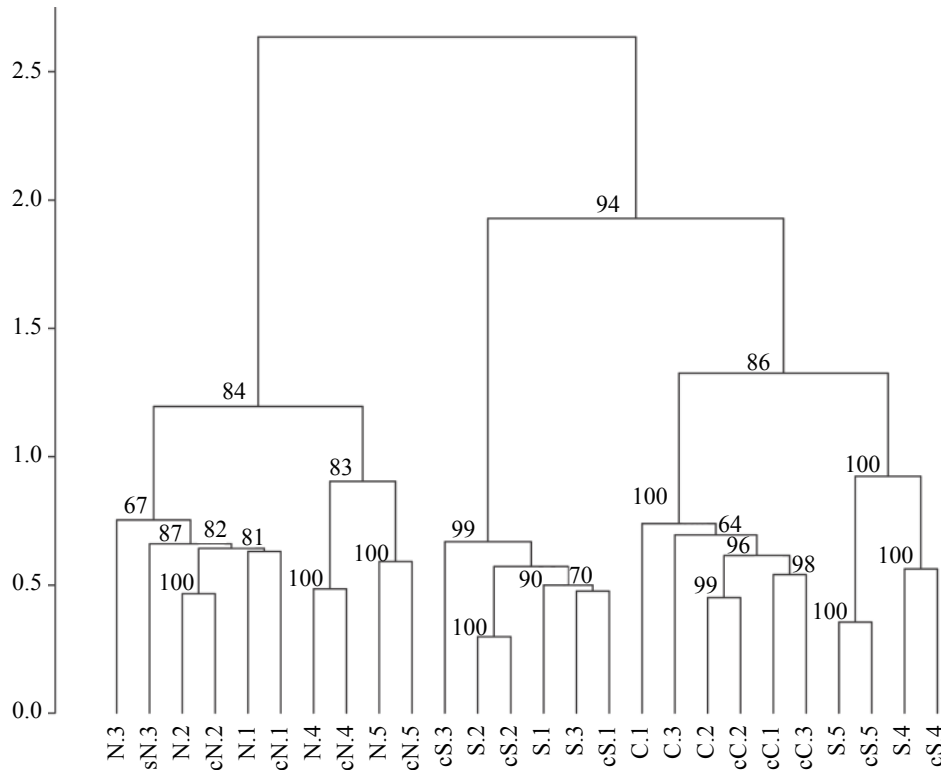


图 4 肠道、水体和底泥微生物的OTU聚类分析图

S1~S5为发病池塘水体菌群；cS1~cS5为健康池塘水体菌群；N1~N5为发病池塘底泥菌群；cN1~cN5为健康池塘底泥菌群；C1~C3为发病尼罗罗非鱼肠道菌群；cC1~cC3为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 4 The OTU cluster of microflora in water, sediment and intestinal tract

S1~S5 stand for the water microflora of diseased pond; cS1~cS5 stand for the water microflora of healthy pond; N1~N5 stand for the sediment microflora of diseased pond; cN1~cN5 stand for the sediment microflora of healthy pond; C1~C3 stand for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC1~cC3 stand for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

菌门所占的比例最大。C组中变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门、广古菌门(Euryarchaeota)和蓝细菌门的丰度显著低于cC组，而放线菌门、消化螺旋菌门(Nitrospirae)、泉古菌门(Crenarchaeota)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的丰度显著高于cC组。

水体、底泥和肠道菌群在属水平上的差异在属水平上对尼罗罗非鱼养殖池塘水体、底泥和尼罗罗非鱼肠道中微生物群落组成进行分析，结果显示，健康池塘水体(cS组)中微生物中丰度位于前三的优势菌群为不动杆菌属(*Acinetobacter*, 9.18%)、红球菌属(*Rhodococcus*, 7.02%)和聚球藻属(*Synechococcus*, 3.26%); 发病池塘水体(S组)微生物的优势菌群结构组成与cS组完全一致，只是丰度存在一定差异。S组菌群中不动杆菌属、*Candidatus aquiluna*、鲸杆菌属(*Cetobac-*

terium)、*Phycococcus*和暖绳菌属(*Caldilinea*)的相对丰度显著高于cS组，而红球菌属、*Luteolibacter*、欧文氏菌属(*Erwinia*)、细杆菌属(*Microbacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、副球菌属(*Paracoccus*)和枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)的丰度显著低于cS组(图6)。

健康池塘底泥(cN组)中微生物丰度位于前三的优势菌群为厌氧粘细菌属(*Anaeromyxobacter*, 2.14%)、鲸杆菌属(0.95%)和甲烷丝菌属(*Methanosaeta*, 0.91%); 发病池塘底泥(N组)中的优势菌群为鲸杆菌属(1.42%)、厌氧粘细菌属(1.28%)和红长命菌属(*Rubrivivax*, 0.77%)。2组的优势菌群组成基本一致，但所占的比例均小于5%，说明底泥中微生物菌群丰富度和均一性较高。N组菌群中鲸杆菌属、红细菌属、曼氏杆菌属(*Mannheimia*)、暖绳菌属、乳球菌属(*Lactococcus*)、细

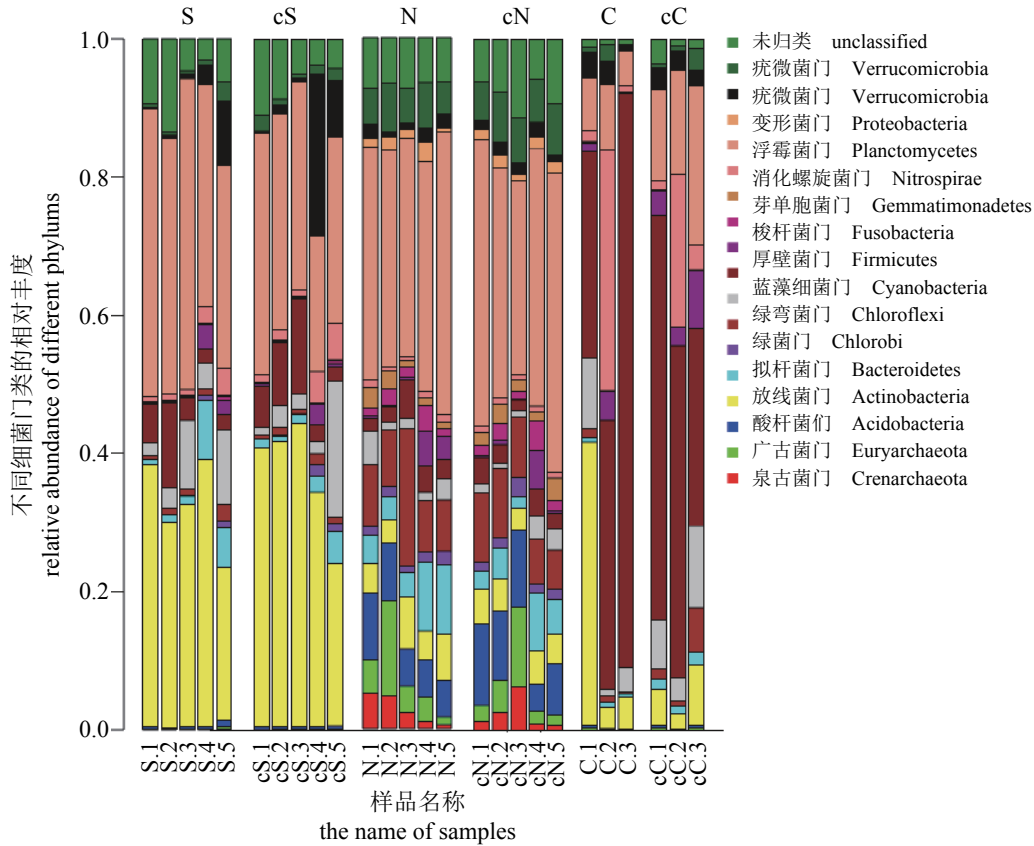


图 5 水体、底泥和肠道菌群在门水平上的物种分布堆叠图

S1~S5为发病池塘水体菌群; cS1~cS5为健康池塘水体菌群; N1~N5为发病池塘底泥菌群; cN1~cN5为健康池塘底泥菌群; C1~C3为发病尼罗罗非鱼肠道菌群; cC1~cC3为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 5 The stacked column graph represents the average percentage of phylum of microflora in water, sediment and intestinal tract

S1-S5 stand for the water microflora of diseased pond; cS1-cS5 stand for the water microflora of healthy pond; N1-N5 stand for the sediment microflora of diseased pond; cN1-cN5 stand for the sediment microflora of healthy pond; C1-C3 stand for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC1-cC3 stand for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

杆菌属和副球菌属的丰度显著高于与cN组, 而厌氧粘细菌属、甲烷丝菌属、*Candidatus aquiluna*和枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)的丰度显著低于cN组(图6)。

健康尼罗罗非鱼肠道(cC组)中微生物丰度位于前三的优势菌群为芽孢杆菌属(*Bacillus*, 13.74%)、乳球菌属(6.36%)和鲸杆菌属(4.69%); 发病尼罗罗非鱼肠道(C组)中的优势菌群为链球菌属(*Streptococcus*, 19.52%), 分枝杆菌属(*Mycobacterium*, 11.59%)和芽孢杆菌属(10.80%), 两组的优势菌群组成差异较大。链球菌属、分枝杆菌属、*Luteolibacter*、曼氏杆菌属、*Candidatus aquiluna*、副球菌属和红长命菌属的丰度显著高于与cC组, 而乳球菌属、鲸杆菌属、假单胞菌

属、甲基暖菌属(*Methylocaldum*)、暖绳菌属、土芽孢杆菌属(*Geobacillus*)、聚球藻属、不动杆菌属、红球菌属、红细菌属、甲烷丝菌属、厌氧粘细菌属、*Knoellia*、欧文氏菌属(*Erwinia*)和细杆菌属的丰度显著低于cC组(图6)。

水体、底泥和肠道中无乳链球菌的丰度差异链球菌发病池塘和健康池塘水体、底泥和鱼体肠道中均能检测到无乳链球菌的存在。发病池塘与健康池塘的水体和底泥中无乳链球菌的丰度并无显著差异, 而C组中无乳链球菌的丰度(19.23%)显著高于cC组中无乳链球菌的丰度(0.43%) ($P < 0.05$)。健康尼罗罗非鱼肠道中无乳链球菌丰度要高于其在水体和底泥中的丰度, 但差异并不显著(图7)。

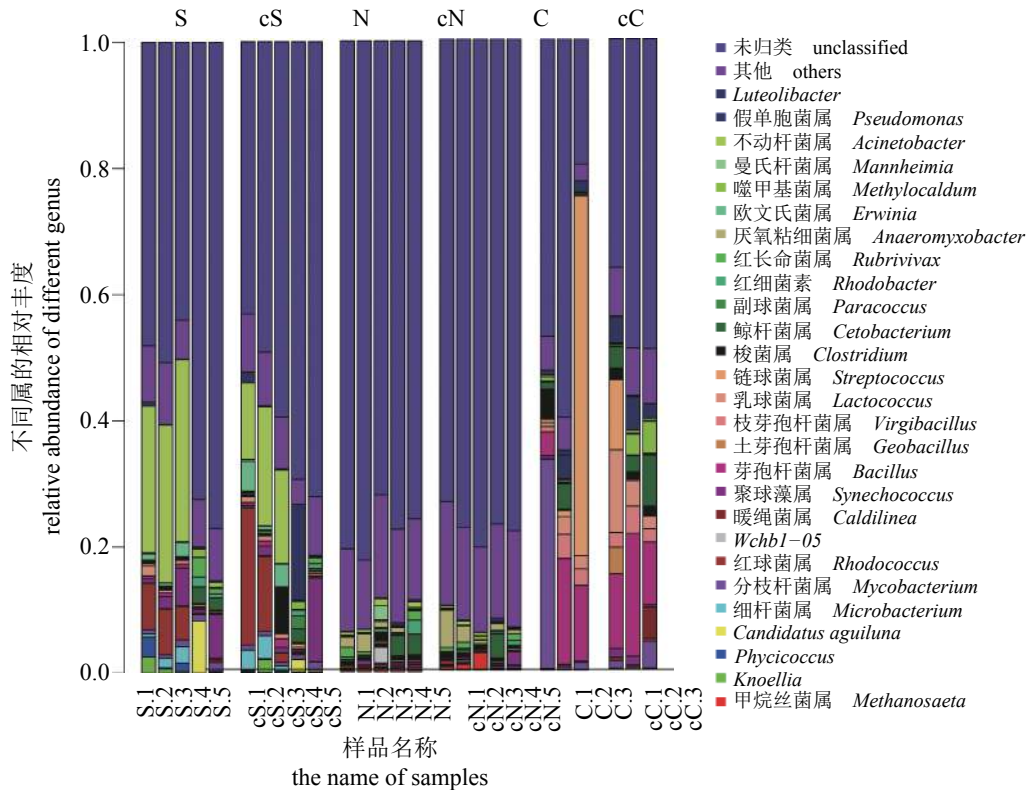


图 6 水体、底泥和肠道菌群在属水平上的物种分布堆叠图

S1~S5为发病池塘水体菌群；cS1~cS5为健康池塘水体菌群；N1~N5为发病池塘底泥菌群；cN1~cN5为健康池塘底泥菌群；C1~C3为发病尼罗罗非鱼肠道菌群；cC1~cC3为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 6 The stacked column graph represents the average percentage of genus of microflora in water, sediment and intestinal tract

S1~S5 stand for the water microflora of diseased pond; cS1~cS5 stand for the water microflora of healthy pond; N1~N5 stand for the sediment microflora of diseased pond; cN1~cN5 stand for the sediment microflora of healthy pond; C1~C3 stand for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC1~cC3 stand for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼肠道及养殖环境中微生物的多样性与链球菌病的相关性

实验采用Hiseq2500高通量测序技术分析了暴发链球菌病以及健康的尼罗罗非鱼肠道、池塘水体和底泥中微生物群落结构组成。结果显示，与健康池塘相比，链球菌病暴发后尼罗罗非鱼肠道和池塘底泥中的微生物多样性降低，而水体中微生物多样性升高，肠道、底泥和水体中菌群的均匀度均降低。张正等^[15]研究也表明，半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)患病后肠道中细菌的种类和多样性显著低于健康鱼肠道中细菌的相应值，这与本实验结果类似。链球菌病感染后，尼罗罗非鱼肠道微生物多样性下降表明肠道内相对稳定的微生物群落有助于动物

抵抗外来有害细菌的感染，正常肠道微生物在抗病原感染中发挥了重要作用^[16]。链球菌病暴发后尼罗罗非鱼养殖池塘水体和底泥中细菌多样性发生变化可能与水体理化因子变化有关。Amal等^[17]研究表明，水温、氨氮、溶解氧、pH和透明度等水质指标的差异与罗非鱼感染无乳链球菌显著相关，同时也会对养殖水体和底泥中细菌种群产生重要影响^[18]。本实验结果还表明，尼罗罗非鱼肠道微生物与水体微生物的相似性较高，与底泥中微生物相似性较低，该结果与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[19]肠道菌群的特点类似，说明尼罗罗非鱼肠道与水体之间存在更多的细菌种类交流，鱼类肠道与外界水环境直接相通，食物和水体中微生物对幼鱼肠道微生物的定殖和肠道菌群稳定结构的形成具有重要影响^[20]。

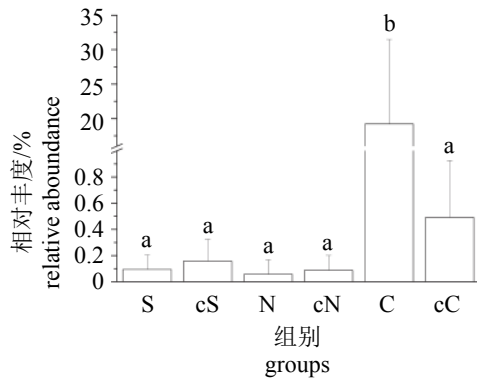


图7 水体、底泥和肠道菌群中无乳链球菌的相对丰度

各组上方字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$); 字母相同表示组间无显著差异($P > 0.05$); S为发病池塘水体菌群; cS为健康池塘水体菌群; N为发病池塘底泥菌群; cN为健康池塘底泥菌群; C为发病尼罗罗非鱼肠道菌群; cC为健康尼罗罗非鱼肠道菌群

Fig. 7 The relative abundance of *S. agalactiae* in microflora of water, sediment and intestinal tract

The different letters above columns represent significant difference, $P < 0.05$; the same letter above columns represent no significant difference, $P > 0.05$; S stands for the water microflora of diseased pond; cS stands for the water microflora of healthy pond; N stands for the sediment microflora of diseased pond; cN stands for the sediment microflora of healthy pond; C stands for the intestinal microflora of diseased *O. niloticus*; cC stands for the intestinal microflora of healthy *O. niloticus*

3.2 尼罗罗非鱼肠道及养殖环境中菌群结构与链球菌病的相关性

微生物群落作为养殖水体中的重要组成成分, 参与水体中C、N、P和S等物质循环, 对维持良好水质和抑制有害微生物的增殖具有重要作用, 同时也间接为水生动物提供营养物质, 保证了整个池塘生态系统的正常运转^[21]。范立民^[22]研究表明, 罗非鱼养殖池塘不同水层的优势菌群均为放线菌门、变形菌门、蓝细菌门和拟杆菌门。本实验结果表明, 健康池塘水体(cS组)与发病池塘水体(S组)中的优势菌群的组成相同, 主要优势菌为放线菌门和变形菌门, 这与上述实验结果类似, 同时也表明链球菌病暴发对水体优势菌群的影响较小。变形菌门是一种多功能菌群, 具有脱氮除磷、降解有机质和降低化学需氧量(COD)的功能, 在污染严重的废水中具有较高的丰度^[23]。Hunter等^[24]研究发现, 疣微菌门在未受污染的沉积物中普遍存在, 在污染的沉积物中出现缺失, 可作为污染程度的指示菌群。浮霉菌门中包含有厌氧氨氧化菌, 对降低养殖水体中氨氮具有重要作用^[25]。本实验结果表

明, S组中变形菌门的比例显著高于cS组, 而疣微菌门和浮霉菌门的丰度显著低于cS组, 这表明链球菌病发病池塘养殖水体环境出现恶化。N组和cN组微生物中的优势门类和优势菌属基本一致, 且与其他罗非鱼池塘沉积物中微生物组成的研究结果相类似^[22, 26]。与cN组菌群结构相比, N组菌群中厌氧粘细菌属、甲烷丝菌属和枝芽孢菌属等具有降解有机质和生态修复功能菌群的丰度较低, 这些差异菌群可通过其代谢活动影响营养元素的物质循环, 决定水质的状况, 从而影响水生动物的生存状态和健康状况^[27]。

本实验结果表明, 发病组和健康组的水体和底泥微生物组成的相似性高, 而尼罗罗非鱼肠道微生物在健康组和发病组之间存在显著差异, 这说明肠道菌群结构变化与尼罗罗非鱼链球菌的感染密切相关。鱼类肠道微生物之间相互协调的关系在增强动物机体抵抗力、调节胃肠道生态环境、促进营养物质在肠道的消化吸收以及保持机体良好的健康状况中起着重要作用, 分析肠道菌群结构特征可作为评估机体健康状况的重要指标^[6]。蒋长苗等^[28]研究发现, 发生肠炎的草鱼(*Ctenopharygodon idella*)肠道中点状产气单胞菌(*Aeromonas punctata*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠球菌(*Enterococcus*)显著增加, 而乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)数量减少, 厌氧菌与需氧菌比值显著下降, 并推断以厌氧菌显著下降为特征的菌群失调是草鱼肠炎的发病机制之一。本实验结果表明, cC组与C组在属水平上的差异较大, C组中链球菌属、分枝杆菌属和曼氏杆菌属等致病菌群的丰度显著高于cC组, 而乳球菌属、鲸杆菌属和红球菌属等益生菌的丰度显著低于cC组。这说明链球菌病感染后肠道菌群的结构遭到严重破坏, 无乳链球菌病原菌占据绝对优势, 其他致病菌的丰度也增加, 通过竞争性排斥作用导致肠道中原有正常菌群和有益菌群的丰度急剧减少, 整个肠道微生态环境紊乱。

3.3 尼罗罗非鱼肠道及养殖环境中无乳链球菌丰度与链球菌病的相关性

无乳链球菌为我国罗非鱼链球菌病的主要致病菌, 实验条件下通过腹腔注射、浸泡和口服等方式均可成功感染罗非鱼, 导致其发病死亡^[29]; 但在自然条件下, 患病罗非鱼体内无乳链球菌的主要来源并不明确, 饲料、水体和鱼体

之间的水平传播都被认为是链球菌病传播的重要途径^[2]。本实验结果表明,链球菌病发病组和健康组的尼罗罗非鱼肠道以及池塘水体和底泥中均能检测到无乳链球菌的存在,但只在发病和健康尼罗罗非鱼肠道中无乳链球菌的丰度存在显著差异,这说明无乳链球菌为广泛分布于养殖环境和尼罗罗非鱼肠道中的条件致病菌,尼罗罗非鱼链球菌病的暴发并不是由于水体或底泥环境中病原菌丰度的剧增所引起,但与肠道中无乳链球菌丰度的急剧增加密切相关。Iregui等^[30]研究表明,无乳链球菌口服和浸泡感染罗非鱼后30 min,在胃肠道中就能够检测到,并且在整个感染过程中保持较高丰度,而在其他组织中则无法持续检测到,从而认为罗非鱼胃肠道上皮细胞是无乳链球菌侵染的主要部位;并推测其致病过程为先在胃肠道中大量增殖,侵染后通过血液循环到达全身各系统,从而导致各组织损伤。发病尼罗罗非鱼肠道中无乳链球菌丰度升高可能与微生态平衡破坏后肠道内潜伏的无乳链球菌大量增殖有关,而高水温、低溶解氧和水质恶化等环境因子的变化是重要诱因^[30-31]。

参考文献:

- [1] 张新艳,樊海平,钟全福,等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 772-779.
Zhang X Y, Fan H P, Zhong Q F, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5): 772-779(in Chinese).
- [2] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 75-79.
Lu M X. Review of research on streptococcosis in tilapia[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(1): 75-79(in Chinese).
- [3] Ye X, Li J, Lu M X, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China[J]. Fisheries Science, 2011, 77(4): 623-632.
- [4] Servin A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(4): 405-440.
- [5] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H, et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus[J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27(6): 319-326.
- [6] 陈孝焯,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[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(5): 523-528.
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(in Chinese).
- [7] Villamil L, Reyes C, Martínez-Silva M A. *In vivo* and *in vitro* assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes: Cichlidae) culture improvement[J]. Aquaculture Research, 2014, 45(7): 1116-1125.
- [8] 薛明,何瑶瑶,邱孟德,等. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 785-794.
Xue M, He Y Y, Qiu M D, et al. Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 785-794(in Chinese).
- [9] Blancheton J P, Attramadal K J K, Michaud L, et al. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication[J]. Aquacultural Engineering, 2013, 53: 30-39.
- [10] Pirarat N, Pinpimai K, Rodkhum C, et al. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*[J]. Animal Feed Science and Technology, 2015, 207: 93-103.
- [11] Wang M, Liu G B, Lu M X, et al. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(6): 3163-3173.
- [12] Logares R, Haverkamp T H A, Kumar S, et al. Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(1): 106-113.
- [13] 许波,杨富亚,慕跃林,等. 胃肠道微生物及其分子生

- 态学技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 136-145.
- Xu B, Yang F Y, Mu Y L, *et al.* Molecular ecology applied to gastrointestinal tract microorganisms[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 136-145(in Chinese).
- [14] 张家松, 段亚飞, 张真真, 等. 对虾肠道微生物菌群的研究进展[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 114-119.
- Zhang J S, Duan Y F, Zhang Z Z, *et al.* Research progress of intestinal microbial flora in shrimp[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 114-119(in Chinese).
- [15] 张正, 廖梅杰, 李彬, 等. 两种疾病发生对养殖半滑舌鲷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).
- [16] 宋增福, 吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474.
- Song Z F, Wu T X. Review on intestinal normal microflora in fish[J]. Fisheries Science, 2007, 26(8): 471-474(in Chinese).
- [17] Amal M N A, Saad M Z, Zahrah A S, *et al.* Water quality influences the presence of *streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 313-323.
- [18] 张皓. 养殖环境微生物群落的动态变化及与水环境的互作[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- Zhang H. The dynamic changes of microbial communities in aquaculture environment and interactions with water environment[D]. Suzhou: Soochow University, 2015(in Chinese).
- [19] 李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 245-255.
- Li C Y, Xu Y J, Liu X Z, *et al.* Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond-and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 245-255(in Chinese).
- [20] 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.
- [21] 李革雷, 陈昌福, 高宇, 等. 3种养殖模式水体中细菌多样性研究[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 381-390.
- Li G L, Chen C F, Gao Y, *et al.* Biodiversity of aquatic microbial communities in three aquacultural systems[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(3): 381-390(in Chinese).
- [22] 范立民. 吉富罗非鱼养殖池塘微生物群落研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Fan L M. Microbial community in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultural ponds[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [23] 王海燕, 周岳溪, 戴欣, 等. 16S rDNA克隆文库方法分析MDAT-IAT同步脱氮除磷系统细菌多样性研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(6): 903-911.
- Wang H Y, Zhou Y X, Dai X, *et al.* Bacterial diversity study for the simultaneous nitrogen and phosphorus removal system (MDAT-IAT) by 16S rDNA cloning method[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(6): 903-911(in Chinese).
- [24] Hunter E M, Mills H J, Kostka J E. Microbial community diversity associated with carbon and nitrogen cycling in permeable shelf sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5689-5701.
- [25] Van Kessel M A H J, Harhangi H R, Van De Pas-Schoonen K, *et al.* Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems[J]. Aquaculture, 2010, 306(1-4): 177-184.
- [26] 史丽娜, 可小丽, 刘志刚, 等. 罗非鱼-鱼腥草共生养殖池塘沉积物菌群结构与功能特征[J]. 中国农学通报, 2015, 31(14): 64-73.
- Shi L N, Ke X L, Liu Z G, *et al.* Effect of *Houttuynia cordata* floating-bed on the structure and function of bacterial community in the sediments of tilapia aquacultural system[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(14): 64-73(in Chinese).
- [27] 屈建航, 李宝珍, 袁红莉. 沉积物中微生物资源的研究方法及其进展[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2636-2641.
- Qu J H, Li B Z, Yuan H L. Methodology in studies of microbial resource in sediment[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(6): 2636-2641(in Chinese).

- [28] 蒋长苗, 鲍传和, 马元山. 草鱼肠道正常菌群与肠炎病原菌关系的初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 1992, 14(1): 55-58.
Jiang C M, Bao C H, Ma Y S. Relationship between bacterial L. flora in intestine of grass carp and *Aeromonas punctata*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1992, 14(1): 55-58(in Chinese).
- [29] Abdullah S, Omar N, Yusoff S M, *et al.* Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis* spp.)[J]. Springer-Plus, 2013, 2: 286.
- [30] Iregui C A, Comas J, Vásquez G M, *et al.* Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(2): 205-215.
- [31] Rodkhum C, Kayansamruaj P, Pirarat N. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 2011, 41(3): 309-314.

Correlation between microflora structure in intestinal tract and aquaculture environment of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and streptococciosis

LIU Zhigang, LU Maixin*, KE Xiaoli, WANG Miao, ZHANG Defeng

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to study the correlation between microbial composition of intestinal tract and aquaculture environment of *Oreochromis niloticus* and streptococciosis, 16S *rDNA* high-throughput sequencing method was used to analyze the microflora structure of intestinal tract of healthy and diseased *O. niloticus* and that of their pond water and sediment. The results showed that the microbial diversity of sediment was higher than that of pond water and *O. niloticus* intestinal tract. The microbial composition of *O. niloticus* intestinal tract was more similar to pond water than to sediment. The microbial diversity of *O. niloticus* intestinal tract and sediment in the disease group was lower than that in the healthy group, while the microbial diversity of pond water in the disease group was higher compared with the healthy group. The OTU cluster analysis revealed that significant difference only existed in intestinal microorganism between the disease group and the health group. The majority of healthy intestinal samples were clustered together. The microflora structure analysis showed that the dominant bacteria of pond water and sediment in the healthy group and the disease group were similar. The abundance of proteobacteria and fusobacteria was far higher in the disease group of pond water, while the abundance of verrucomicrobia and planctomycetes was obviously lower compared with the healthy group of pond water. The abundance of flora with the function of organic degradation and ecologic restoration (such as *Anaeromyxobacter*, *Methanosaeta* and *Virgibacillus*) was far lower in the sediment of disease group, while the abundance of pathogenic bacteria (such as *Mannheimia*) was higher compared with the sediment of healthy group. The abundance of pathogenic bacteria (such as *Streptococcus*, *Mycobacterium* and *Mannheimia*) in intestinal tract of disease group was higher, while the abundance of probiotics (such as *Lactococcus*, *Cetobacterium* and *Rhodococcus*) was lower compared with intestinal tract of healthy group. *Streptococcus agalactiae* was detected not only in aquaculture environment and intestinal tract of the disease group but also in those of the healthy group. The abundance of *S. agalactiae* in intestinal tract of the disease group was significantly higher than that in the healthy group, while there was no significant difference between the disease group and the health group either for pond water or sediment. In conclusion, the variation of the abundance of pathogenic bacteria and probiotics in pond water and sediment revealed that the aquaculture environment of the diseased pond was deteriorated. The outbreak of streptococciosis was closely related to the rapidly increased abundance of *S. agalactiae* in the intestinal tract of *O. niloticus* after its microecological balance had been destroyed. The increased abundance of *S. agalactiae* in the intestinal tract of infected *O. niloticus* had no direct link with its abundance in pond water or sediment.

Key words: *Oreochromis niloticus*; streptococciosis; intestinal microflora; environmental microflora; 16S *rDNA* high-throughput sequencing technique

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); Natural Science Foundation of Guangdong Province(2016A030313146); Science and Technology Program of Guangzhou (201707010312); Fish Disease Prevention and Control Special Foundation of Guangdong Province (20170070000600403)