

## 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析

李存玉<sup>1,2</sup>, 徐永江<sup>1</sup>, 柳学周<sup>1\*</sup>, 杨洪军<sup>3</sup>,  
史 宝<sup>1</sup>, 史学营<sup>1,2</sup>, 朱学武<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 日照市水利养殖场,山东 日照 276805)

**摘要:**为研究池塘和工厂化养殖条件下牙鲆肠道菌群结构差异及其与饵料、水环境及底质等的关系,采用 MiSeq 高通量测序技术和生物信息学分析手段,构建牙鲆肠道、养殖水体、饵料和池塘底泥等 7 个样品的 16S rRNA 基因测序文库,分析不同样品中的菌群组成和生物多样性。结果表明:池塘养殖牙鲆肠道(B1)中以厚壁菌门(30.49%)、变形菌门(19.16%)和梭杆菌门(11.11%)为主,其中芽孢杆菌属(27.66%)占绝对优势,弧菌属(0.16%)丰度最小;工厂化养殖牙鲆肠道(B5)中以变形菌门(44.31%)、厚壁菌门(11.57%)和放线菌门(4.79%)为主,其中不动杆菌属(10.37%)丰度最大,弧菌属(4.05%)相对 B1 丰度较高。牙鲆肠道优势菌群主要与营养代谢调节相关,同时有益微生物和有害微生物也是肠道菌群的重要组成部分。差异性和系统进化分析表明两种养殖条件下牙鲆肠道菌群结构与饵料中菌群关系密切,此外受养殖水环境中菌群影响较大。研究结果为今后牙鲆养殖专用高效微生态制剂的研制和养殖环境微生态调控技术构建提供理论依据。

**关键词:**牙鲆;肠道菌群结构;16S rRNA;MiSeq 高通量测序

**中图分类号:**Q 938.8;S 965

**文献标志码:**A

脊椎动物肠道内富集大量的微生物,以厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)为主<sup>[1]</sup>。肠道菌群与宿主共同进化,部分细菌适应宿主内部环境,通过长期的自然选择,定植菌群、宿主与环境之间形成一个相对稳定的微生态系统,增强了宿主对不良影响因子的自我调节能力。鱼类肠道菌群的定植过程非常复杂,一般认为发生在幼鱼阶段,受到多种因素的影响,目前,大多数研究表明其形成主要与鱼卵表面、饵料和养殖水环境中的细菌有关,其中饵料和水环境对肠道菌群的定植影响较大<sup>[2]</sup>。

肠道菌群在营养<sup>[3]</sup>和防御<sup>[4]</sup>等方面对宿主健康发挥重要的调节作用<sup>[5]</sup>,其分泌代谢产物

中含有多种酶,能够帮助宿主分解食物中的有机物,增强宿主对营养物质的消化吸收;有些细菌能够分泌抗生素类物质,可阻止病原微生物侵入宿主体内。Xia 等<sup>[6]</sup>研究发现饥饿会造成石斑鱼(*Epinephelus* sp.)肠道内菌群结构发生变化,相关研究结果显示<sup>[7-9]</sup>食物是影响肠道菌群结构的关键因子,Moran 等<sup>[10]</sup>认为鱼类肠道菌群结构与宿主的个体发育程度及其对食物的选择密切相关,Romero 等<sup>[2]</sup>认为食物和水环境对幼鱼阶段肠道微生物的定植起到重要作用,并最终决定了成鱼肠道内相对稳定的菌群结构。随着我国水产养殖业的快速发展,研究养殖生物肠道菌群的结构及演替规律可为生态健康养殖技术提供理论支撑。然而,自然界中仅

收稿日期:2014-09-23 修回日期:2014-11-23

资助项目:国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)

通信作者:柳学周,E-mail:liuxz@ysfri.ac.cn

有大约1%的细菌可培养,绝大多数细菌无法在实验室条件下进行分离纯化<sup>[11]</sup>。传统的研究方法如PCR-DGGE、Sanger测序和指纹印记等具有一定局限性<sup>[12-13]</sup>,只能分析丰度较大的细菌,无法鉴定丰度极小的微生物,导致研究结果与样品中真实的菌群结构存在较大偏差。MiSeq测序是近年来兴起的新一代微生物高通量测序技术,基于细菌16S rRNA基因在功能上的高度保守性以及对应序列不同位点的高变性,能够准确的反映生物物种之间的亲缘关系和差异<sup>[14]</sup>。该方法可同时定量分析多个样本中细菌、古生菌、真核微生物的群落结构,真实、全面地反映样品中微生物群落结构的基本特征。

人类和脊椎动物肠道菌群的相关研究已经取得了诸多进展<sup>[15-17]</sup>,然而对水生生物特别是鱼类肠道菌群的认识还十分匮乏,关于不同养殖环境下多种因素对养殖生物肠道菌群结构影响的报道更为鲜见。本研究以池塘和工厂化养殖牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)为实验对象,一方面,研究2种养殖模式下牙鲈肠道菌群结构的异同;另一方面,分析水质指标、水环境、底质和食物等因子与牙鲈肠道菌群结构的相互关系,鉴定优势菌群,为研制牙鲈养殖专用高效微生态制剂和构建养殖环境微生态调控技术提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

样品于2013年9月取自山东省日照市,样品采集前,使用YSI QS600水质监测仪(YSI,美国)测量2种养殖模式下温度、盐度、溶解氧及pH等水质参数。池塘养殖模式下牙鲈样品取自日照市水利养殖场的3个4.5 hm<sup>2</sup>的养殖池塘中,池塘为方形,泥沙底质,平均水深2.0 m,养殖期间日换水率50%,以鲜杂鱼投喂,取样时水温21℃,盐度29,溶氧6.0 mg/L, pH 7.9;工厂化养殖模式下牙鲈样品取自位于同一地区的日照市东港区海珍品研究所的工厂化养殖车间的3个养殖池中,养殖池为方形抹角水泥池,面积约35 m<sup>2</sup>,养殖水深0.5 m,用自然海水沙滤后流水养殖,日换水量为600%,取样时水温22℃,溶氧7.0 mg/L,盐度29, pH 7.8,投喂饵料为干性颗粒配合饲料。

### 1.2 样品采集方法

取样前停食24 h,2种养殖模式下相同规格的牙鲈各取3尾健康牙鲈[体质量(262 ± 29.15) g,体长(27.5 ± 1.73) cm],以280 mg/L的MS-222麻醉后采集样品。

肠道样品采集:实验鱼置于冰上,解剖后取出肠道,分别取前肠、中肠和后肠各一段,置于15 mL的无菌冷冻管中,迅速放入液氮中保存。

泥样采集:用不锈钢柱状采泥器采集3个养殖池塘的底泥,采集点分别位于进水口处、排水口处和增氧机附近,每处采集3次(约20 g)样品,置于15 mL的无菌冷冻管中,立即放入液氮中保存。

水样采集:用透明的卡盖式采水器采集两种养殖模式的水样各2 L(3个重复),水样经0.22 μm的滤膜真空抽滤后,将滤膜取出放置于15 mL的无菌冷冻管中,立即放入液氮中保存。

饵料样品采集:取池塘养殖条件下投喂的鲜杂鱼3尾(全长10 cm左右),绞碎匀浆后置于15 mL的无菌冷冻管中,放入液氮中保存。取工厂化养殖模式下饲喂的干性颗粒配合饲料100 g,装入洁净的封口袋中投入液氮保存。

样品采集后进行编号分类保存,其中池塘养殖牙鲈肠道样品编号B1,工厂化养殖牙鲈肠道样品编号B5,池塘养殖水样品编号A1,工厂化养殖车间水样品编号A8,池塘底泥样品编号C7,鲜杂鱼样品编号E1,干性颗粒配合饲料样品编号E3。

### 1.3 基因组DNA提取

使用土壤基因组DNA提取试剂盒(OMEGA,美国)提取细菌基因组DNA。水样中微生物基因组DNA提取时,先取出滤膜,将每个实验组中的3个平行样各剪取二分之一,置于15 mL离心管中,加入1~3 mL Buffer SLX Mlus,用剪刀尽量将滤膜剪碎;称取0.5 g颗粒饲料,用研钵磨碎,置于15 mL离心管中,加入1~3 mL Buffer SLX Mlus;肠道样品基因组DNA提取时,将每个实验组中的3个平行样各剪取黄豆粒大小的组织块,置于研磨管中,加入1~3 mL Buffer SLX Mlus,研磨至无块状组织为止,将研磨液转移至15 mL离心管中;称取泥样2~5 g,置于15 mL离心管中。所有样品的DNA提取步骤均参照土壤DNA提取试剂盒说明书。对提取到的样品基因组DNA进行1%琼脂糖凝胶电泳检测

质量。

#### 1.4 高通量测序分析

针对细菌 16S rRNA 基因 V3 + V4 区设计含 barcode 的特异引物 338F/806R, 引物序列为: 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。PCR 扩增采用 20  $\mu$ L 反应体系: 5  $\times$  FastPfu Buffer 4  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 引物 338F/806R 各 0.4  $\mu$ L, Taq 酶 0.4  $\mu$ L, 模板 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.2  $\mu$ L。PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 变性 120 s; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 5 min 延伸。

PCR 产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰, 片段大小合适 (430 bp 左右), 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 切胶回收 PCR 产物, 以 Tris-HCl 洗脱后连接“Y”接头, 使用磁珠筛选去除接头自连片段, 按照每个样品测一万条序列加入 1 ng PCR 产物的标准富集 PCR 产物, 然后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液变性, 获得单链 DNA 片段, 构建测序文库后在 16s-338F-806R Miseq 平台进行高通量测序 (美吉生物公司, 上海)。

#### 1.5 数据分析

数据分析流程: 数据处理  $\rightarrow$  OTU 聚类  $\rightarrow$  分类学分析; 分析方法: 1) 利用 uparse (version 7.1 <http://qiime.org/>) 软件平台进行 OTU 聚类, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并在各个水平上统计每个样品的群落组成; 2) 利用 Mothur 软件做稀释性曲线分析; 3) 分别利用香农指数 (Shannon)、辛普森指数 (Simpson) 和物种丰富度指数 (ACE) 公式计算细菌生态多样性指数; 4) 利用 Excel 和 Mothur 软件制作 Venn 图; 5) 利用 Fasttree 软件 + R 语言制作热图; 6) 利用 R 语言制作主成分分析图; 7) 利用 SPSS 软件 (16.0 版本) 对数据做差异显著性分析, 设置差异显著性水平  $P = 0.05$ , 当  $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 基于 16S rRNA 基因测序的细菌多样性

以 97% 相似性水平为标准划分可操作分类单元 (OTU), B1、B5、A1、A8、C7、E1 和 E3 样品数据分别可划分为 309、328、228、297、646、122 及

126 个 OTU, 主要代表厚壁菌门、变形菌门、放线菌门 (Actinobacteria)、梭杆菌门、蓝藻门 (Cyanobacteria)、拟杆菌门和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 7 个优势菌门。基于随机选取一定数量的测序序列及其对应的 OTU 种类得到的稀释性曲线 (图 1), 结果表明本次取样深度可信, 测序结果能够真实地反映样品中优势细菌的数量关系。通过样品测序序列计算各样品中细菌多样性指数 (表 1), 其中 C7 样品的香农指数最大为 4.96, 辛普森指数最小为 0.020, 即池塘底泥中的细菌多样性最高; E3 样品的香农指数最小为 1.70, 辛普森指数最大为 0.336, 表明干性颗粒饲料中的细菌多样性最低。综合分析两种养殖模式下各样品的细菌多样性, 发现 B1 样品的细菌多样性高于 B5, 即池塘养殖牙鲆肠道菌群多样性高于工厂化养殖牙鲆, 而同时发现 E1 菌群多样性高于 E3, C7 中菌群多样性最高, 表明池塘养殖条件下牙鲆肠道菌群的多样性与饵料和底质有密切的关系, 但结果显示 A1 样品的细菌多样性低于 A8 样品, 可能与养殖车间水系统中长期累积了多种微生物的存在有关。由此可推断牙鲆肠道菌群多样性受到多个环境因子的共同调控。

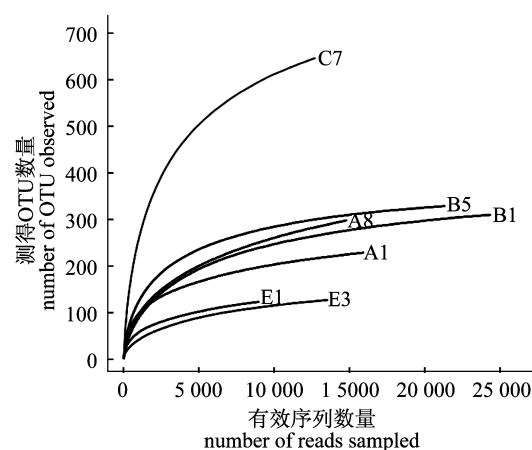


图 1 稀释性曲线

A1. 池塘水样; B1. 池塘牙鲆肠道样品; C7. 池塘底泥样品; E1. 池塘饵料样品; A8. 工厂化水样; B5. 工厂化牙鲆肠道样品; E3. 工厂化饵料样品。下同

Fig. 1 Rarefaction curve

A1. pond water; B1. pond-culture Japanese flounder intestine; C7. pond sediment; E1. frozen bait fish; A8. indoor culture water; B5. tank-culture Japanese flounder intestine; E3. commercial diet. The same as the following

表1 基于16S rRNA基因序列的细菌多样性指数

Tab.1 Bacterial diversity index based on 16S rRNA gene sequences

样品 sample	有效序列数 sequences	可操作分类单元 OTU	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	物种丰富度指数 ACE
A1	15 897	229	2.98	0.169	283
A8	14 760	298	3.06	0.100	466
B1	24 298	310	2.31	0.254	350
B5	21 279	329	3.34	0.112	357
C7	12 680	647	4.96	0.020	746
E1	8 942	123	2.12	0.311	183
E3	13 519	127	1.70	0.336	170

## 2.2 菌群结构组成

对全部样品的有效序列进行归类操作分析,统计不同分类单元所对应的细菌门类及相对丰度。研究表明,不同模式下不同样品之间的菌群结构存在较大差异。B1中厚壁菌门相对丰度最大,对应OTU数量占该样品全部OTU的30.49%,变形菌门占19.16%,梭杆菌门占11.11%;B5中变形菌门相对丰度最大,占

44.31%,厚壁菌门占11.57%,放线菌门占4.79%;C7中以变形菌门和拟杆菌门为主,占总量的64.81%;饵料中以厚壁菌门和变形菌门为主,在E1中这两种细菌占总量的96.41%,在E3中占77.23%;水环境中以变形菌门、拟杆菌门和蓝藻门为主,A1和A8中优势菌的种类和组成差异明显,A1中以蓝藻门丰度最高(47.11%),而A8中以变形菌门为优势菌(61.25%)(表2)。

表2 各样品优势细菌门类及相对丰度

Tab.2 Advantage bacterial phyla and the relative abundance of each sample

	A1	A8	B1	B5	C7	E1	E3
厚壁菌门 Firmicutes	0.26	0.26	30.49	11.57	5.13	66.05	64.46
变形菌门 Proteobacteria	24.03	61.25	19.16	44.31	45.58	30.36	12.77
梭杆菌门 Fusobacteria	0.08	0.03	11.11	1.56	2.44	0.30	0.13
放线菌门 Actinobacteria	1.55	1.33	1.70	4.79	0.83	0.31	0.23
拟杆菌门 Bacteroidetes	26.73	19.29	0.05	0.02	19.23	1.54	0.39
蓝藻门 Cyanobacteria	47.11	14.61	0.09	0.08	0.30	1.36	0.22
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.11	0.47	0.07	0.01	0.40	0.022	/

注:表格中“/”表示未检出

Notes: The symbol “/” means non-detected

筛选出每个样品中相对丰度最高的前十种OTU所对应的细菌,在属水平上对每个样品的菌群结构及分布进行统计分析(图2)。结果表明,A1中可分类的细菌主要是黄杆菌科(Flavobacteriaceae)的NS3a菌属(10.74%),其他按丰度由高到低依次为假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*);A8中主要是黄杆菌科的NS3a菌属(13.08%)和假交替单胞菌属(10.75%);B1中主要是芽孢杆菌属(27.66%),其他按丰度由高到低依次为不动杆菌属、发光杆菌属、军团杆菌属、弧菌属;B5中不动杆菌属(10.37%)、芽孢杆菌属(9.42%)、发光杆菌属(7.32%)、军团杆菌属(*Legionella*,7.32%)和弧

菌属(4.05%)相对丰度差异不显著;C7中主要是黄杆菌科(Flavobacteriaceae)的*Marinicella*属(10.95%)以及 $\gamma$ 变形菌纲(Gammaproteobacteria)的*Actibacter*属(9.95%);E1中主要是芽孢杆菌属(58.13%),其次是弧菌属(12.61%)和肠弧菌属(*Enterovibrio*,6.79%);E3中主要是芽孢杆菌属(56.37%),其他菌属相对丰度均低于0.50%。

## 2.3 基于OTU数量的牙鲈肠道菌群结构

在门和属的分类水平上分别对牙鲈肠道菌群组成进行鉴定,结果表明两种养殖模式下牙鲈肠道中的优势菌种类相同,但同种优势菌的数量分布存在较大差异。基于B1和B5样品中全部OTU做Venn图,比较两个样品间的差异。牙鲈肠道样品有效OTU总数为367个,两种养殖模式下牙鲈肠道共有OTU数为270个(图3),对应的

优势细菌包括芽孢杆菌属、不动杆菌属、军团菌属、发光杆菌属和弧菌属(图 2),占 OTU 总数的 73.57%;B1 特有的 OTU 数为 39 个,对应的细菌主要是梭菌属(*Fusobacterium*)、稳杆菌属(*Empedobacter*)、黄杆菌属(*Xanthobacter*)和盐单胞菌属(*Halomonas*),占 OTU 总数的 10.63%,B5 独有的 OTU 数为 58 个,对应的细菌主要是氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、乳杆菌属

(*Lactobacillus*)、固氮螺菌属(*Azospira*)和假交替单胞菌属,占 OTU 总数的 15.80%。可知池塘和工厂化养殖模式下,芽孢杆菌为牙鲈肠道优势菌群,这为专用高效微生态制剂的研制提供了认知基础。另外,两种养殖模式下牙鲈肠道内均具有一定比例的特有菌属,在苗种来源相同的前提下,我们认为水环境、底质和饵料是造成池塘和工厂化养殖牙鲈肠道菌群结构差异的重要因素。

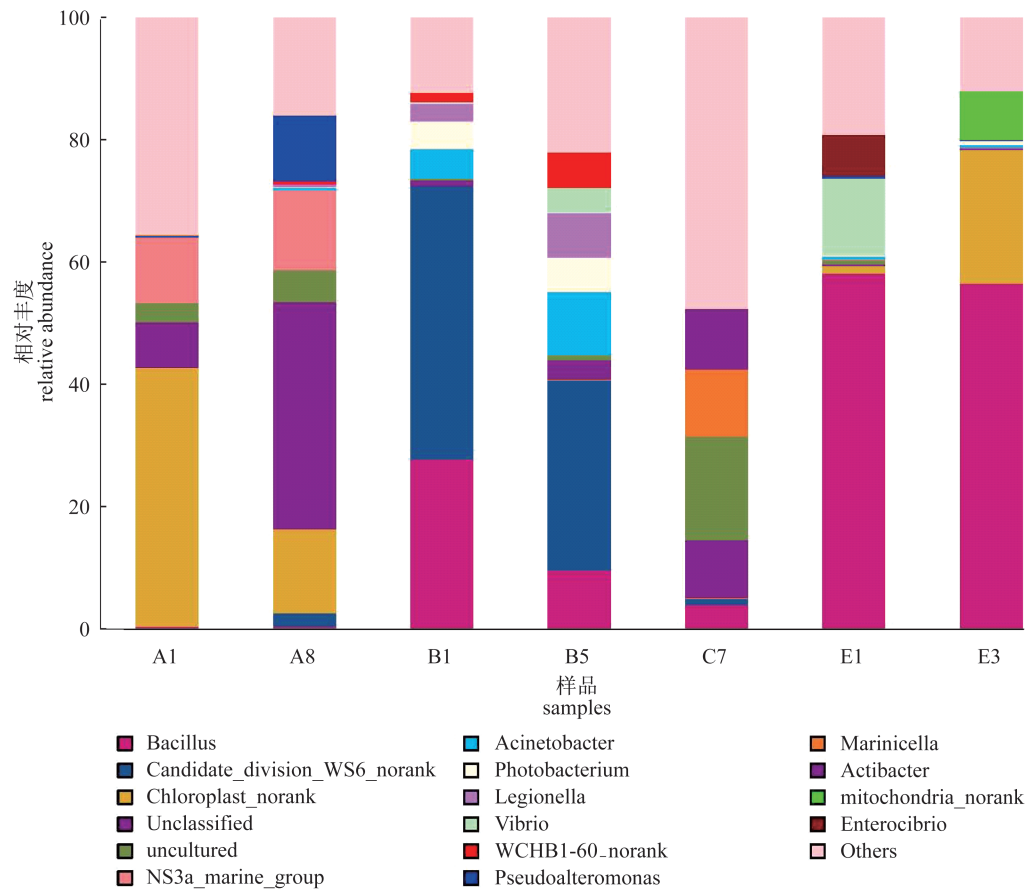


图 2 样品中属水平细菌种群结构及分布

Fig. 2 Bacterial communities and distribution of the samples at the genus level

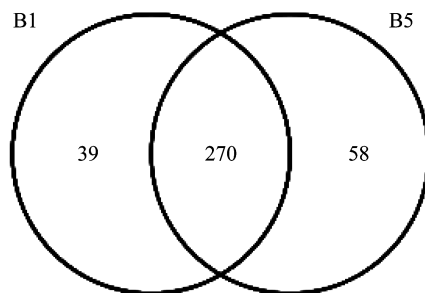


图 3 两种养殖模式牙鲈肠道共有 OTU 分析图

Fig. 3 Shared OTU analysis of the *Paralichthys olivaceus* intestine in two culture environment

#### 2.4 牙鲈肠道菌群结构的影响因子

为了进一步探究牙鲈肠道菌群结构与相关环境因子的关系,构建了含系统发育树、样品聚类关系树的热图(图 4)。热图的不同颜色代表不同的相对丰度,图左侧即为采用邻位连接法在属水平上构建的基于 7 个样品全部 OTU 的系统发育进化树,图顶端为样品间聚类关系树。结果显示,B5 紧邻 B1,然后由近及远依次为 E3、E1、A8、A1 和 C7,结合各样品间菌群的进化关系,本次研究发现肠道菌群(B5、B1)与食物(E3、E1)中菌群的进化关系要近于肠道菌群与水环境中菌群(A8、

A1)的进化关系,池塘养殖模式下的牙鲆肠道菌群(B1)与池塘底泥中菌群(C7)的进化关系最远(图4)。分析结果显示,B1和B5距离较近,说明池塘与工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构相似度高,Metastats差异性分析 $P > 0.1$ ;A1、A8与C7距离较近,说明池塘养殖水环境、工厂化养殖水环境以及池塘底泥中的菌群结构相似度高;E1与E3相距较近,说明鲜杂鱼饵料和干性颗粒饲料中菌群

结构相似度高(图5)。以两坐标轴的零基准线为参考,其中B1、B5、E1、E3与PC1轴相距较近,说明这4个样品中菌群结构受主成分PC1的影响大,占总影响因子的57.92%,A1、A8、C7与PC2轴相距较近,说明这3个样品中菌群结构受主成分PC2的影响大,占总影响因子的26.09%,PC1、PC2两种主成分对样品中菌群结构的影响程度达到总影响因子的86.01%(图5)。

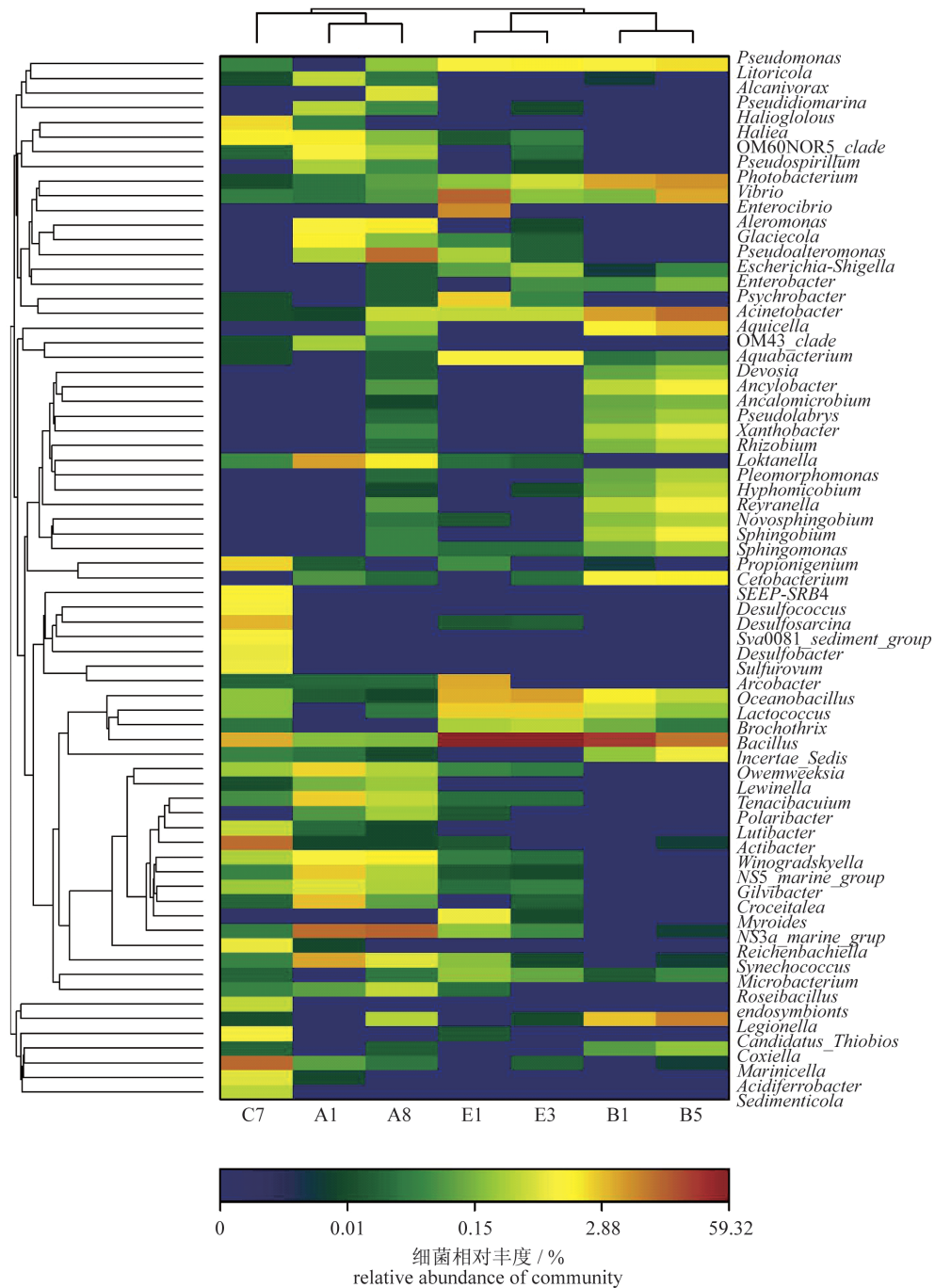


图4 含系统发育进化树的热图

Fig. 4 Heatmap with Phylogenetic tree

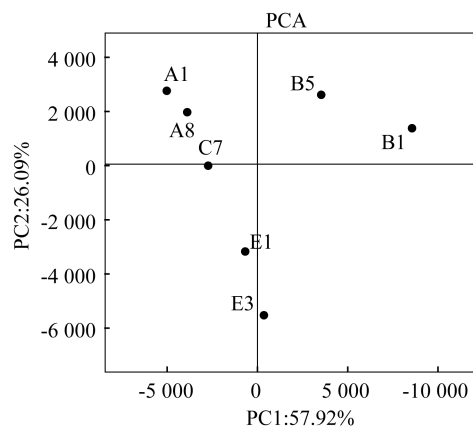


图5 不同样品主成分分析图

Fig. 5 Sorting analysis of different samples

基于样品总 OTU 数做 Venn 图,进行相似性分析(图6)。取样前对两种养殖模式下的水环境

进行检测,发现 2 种养殖模式下水环境的常规水质指标包括温度、盐度、溶氧量、pH 等差异不显著 ( $P > 0.05$ )。A1 与 B1 共有的 OTU 数为 18 个,占两者 OTU 总数的 3.47%;A8 与 B5 共有的 OTU 数为 127 个,占两者 OTU 总数的 25.5%;C7 与 B1 共有的 OTU 数为 24 个,占两者 OTU 总数的 3.58%;E1 与 B1 共有的 OTU 数为 39 个,占两者 OTU 总数的 12.5%;E3 与 B5 共有的 OTU 数为 47 个,占两者 OTU 总数的 11.5%,A1 与 C7 共有的 OTU 数为 100 个,占两者 OTU 总数的 11.4%。结果显示,2 种养殖模式下牙鲈肠道菌群结构与食物、水环境中的菌群结构相似性最高,池塘底泥与池塘养殖牙鲈肠道菌群结构相似性较低,这说明食物和水环境是影响牙鲈肠道菌群结构的主要因素,池塘底质对牙鲈肠道菌群结构的影响相对较小。

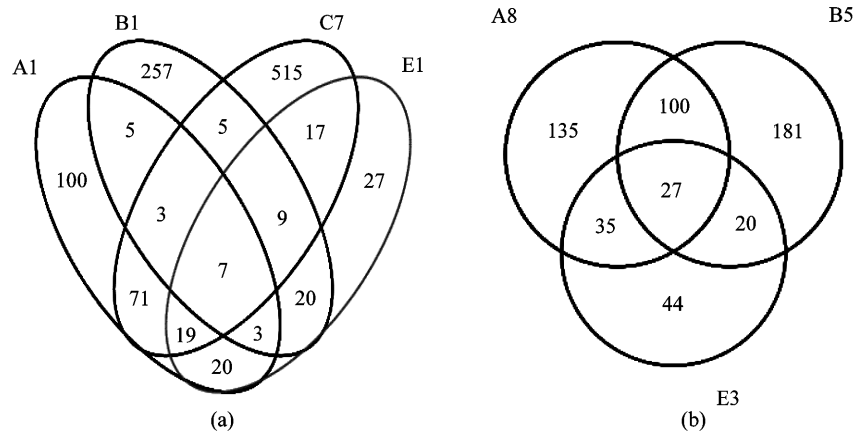


图6 池塘养殖模式(a)和工厂化养殖模式(b)样品间共有 OTU 分析图

Fig. 6 Shared OTU analysis of the samples in pond-culture(a) and tank-culture(b) environment

### 3 讨论

本研究通过对 2 种养殖模式下牙鲈肠道菌群结构的深入分析,认识了牙鲈肠道菌群的一般结构、优势菌群及其影响因素,为今后在生态层面研究牙鲈免疫、营养机能提供了依据,同时也为养殖环境的微生态调控技术构建提供了理论支撑。

肠道微生物对宿主各项生命机能具有十分重要的调节作用,在内环境相对稳定的条件下,绝大多数肠道微生物起到积极的调节作用<sup>[18]</sup>。相关研究显示,淡水鱼肠道内优势菌群主要是气单胞菌(*Aeromonas*)和拟杆菌(*Bacteroides*)<sup>[19-20]</sup>,海水鱼肠道中优势菌群为弧菌<sup>[21-22]</sup>。Tanaasomwang 等<sup>[22]</sup>发现牙鲈仔稚鱼肠道优势菌

群为弧菌和假单胞菌(*Pseudomonas*),与养殖水体中的优势菌群相同。而本实验对牙鲈成鱼的研究结果显示,2 种养殖模式下的牙鲈肠道优势菌群以芽孢杆菌、不动杆菌和发光杆菌为主,研究结果的差异可能与鱼的规格、环境以及食物等密切相关。

本研究发现,池塘和工厂化养殖牙鲈肠道菌群类型相似,但菌群结构存在一定差异。池塘养殖牙鲈肠道(B1)中芽孢杆菌占绝对优势,工厂化养殖牙鲈肠道(B5)中各优势菌种的丰度较接近。两种养殖模式下牙鲈肠道中的芽孢杆菌和弧菌差异显著( $P < 0.05$ ),其他优势菌种在 B1 中的丰度均小于 B5,但差异不显著( $P > 0.05$ )。已有研究表明,芽孢杆菌产胞外酶的能力较强,一方面可以

抑制或杀死病原微生物,增强动物免疫能力;另一方面,有助于分解有机物,提高养殖鱼饵料利用率及生长性能<sup>[23]</sup>。一般情况下肉食性鱼类蛋白酶量大、活性高<sup>[24]</sup>,本研究中池塘养殖牙鲆的饵料为鲜杂鱼,其肠道内大量芽孢杆菌分布对其食物和营养代谢过程可能起重要调控作用,同时还可能在影响微生态制剂的调控方面发挥积极作用。弧菌是造成水产养殖动物患病死亡的主要病原菌<sup>[25]</sup>,严重危害水产养殖业的发展。然而近年来越来越多的证据显示弧菌对宿主有益的一面,Asfie等<sup>[26]</sup>从牙鲆肠道分离到多株能产生蛋白酶的弧菌,并认为这些弧菌分泌的蛋白酶中有部分对牙鲆的生长发育起到一定的作用,Hamid等<sup>[27]</sup>在相关研究中提到弧菌能够分泌蛋白酶、淀粉酶、几丁质酶和卵磷脂酶,参与碳水化合物、脂肪和蛋白质等重要营养物质的消化,这些结果说明了弧菌种类的多样性和其作为优势菌在肠道内的重要调节作用。本研究中,取样对象均为体质健壮的成年牙鲆,B1中少量弧菌和B5中相对多的弧菌,说明弧菌的存在并非是养殖鱼病害发生的必要条件,弧菌致病主要与养殖环境因子恶化造成菌群结构内稳态的失衡密切相关<sup>[28]</sup>,这为微生态调控机制研究和微生态制剂的研制提供了重要线索。

本研究结果显示,B1独有的OTU数为39个,对应的细菌主要是黄杆菌属、梭菌属、稳杆菌属、盐单胞菌属,占OTU总数的10.63%,B5独有的OTU数为58个,对应的细菌主要是假交替单胞菌属、氧芽孢杆菌属、乳杆菌属、固氮螺菌属,占OTU总数的15.80%,其中不乏致病菌和有益菌。如黄杆菌属是柱状病、白头白口病的病原体<sup>[29-30]</sup>,假交替单胞菌能够预防皮肤病的发生,阻止一些海洋细菌的入侵<sup>[31]</sup>。今后,对其肠道特有菌群的研究也将为其养殖生长调节提供新的思路。另外,Gordon等<sup>[32]</sup>对人类和小鼠肠道菌群的研究表明厚壁菌门与营养代谢及体重调节关系密切,而本研究结果显示厚壁菌门在B1、B5中丰度均较大,并在B1中占绝对优势,牙鲆肠道中厚壁菌门菌群与体重生长的关系值得深入研究。

本研究中,分析了2种养殖模式下的牙鲆肠道菌群与养殖水环境、底质、食物中的菌群结构的关系,结果表明在工厂化养殖模式下,水环境中菌群和牙鲆肠道菌群相似性最高,水环境中的菌群很可能直接影响牙鲆肠道菌群结构和稳态;2种

养殖模式下饵料中菌群与牙鲆肠道菌群相似性均较高,表明肠道菌群结构受饵料种类影响较大,系统发育进化分析也表明食物中菌群与牙鲆肠道菌群进化距离最近,水环境对肠道菌群结构影响处于次要地位,底泥的影响相对较小。该结论与Moran等<sup>[10]</sup>的研究结果一致,认为鱼类肠道菌群结构与其食性的转变密切相关。然而,Yoshimizu等<sup>[33]</sup>对鲑科鱼类肠道菌群变化的研究发现水环境对鱼类肠道菌群的影响显著,这种差异可能是由鱼种、地域和水环境的差异引起的。在水环境相对稳定、池塘底泥影响较小的情况下,2种养殖模式下食物与牙鲆肠道菌群结构关系最为密切。理论上,池塘底泥与水接触过程中含丰富的微生物,牙鲆为底栖物种,会随底层水、残饵等接触到大量微生物,本研究发现,池塘底泥C7中菌群生物多样性和丰度远大于A1、A8、E1、E3,但是底泥中菌群与牙鲆肠道菌群相似度却较低、进化关系较其他影响因子远,这可能意味着牙鲆成鱼肠道菌群具有能够维持其定植后初始稳态的内在机制,可抵御外部环境对其菌群结构造成的影响。同时,池塘底泥微生物的高多样性和丰度特征,可能对池塘微生态系统稳定和致病菌的抑制起到积极的调控作用。另外,2种养殖模式下牙鲆肠道内均含特有的菌群,它们与其他优势菌群和养殖环境之间存在怎样的相互关系将是今后研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] Wu S G, Tian J Y, Wang G T, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in frass carp intestine [J]. *Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(5): 2165 - 2174.
- [2] 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.
- [3] Wu S G, Wang G T, Angert E R, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in frass carp intestine [J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(2): e30440.
- [4] Moran D, Turner S J, Clements K D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus* [J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(4): 590 - 597.
- [5] Moore A M, Munck C, Sommer M O, *et al.* Functional metagenomic investigations of the human



- intestinal microbiota [J]. *Front Microbiology*, 2011, 2:188.
- [6] Xia J H, Grace L, Fu G H, *et al.* The intestinal microbiome of fish under starvation [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):1-23.
- [7] Brown K, DeCoffe D, Molcan E, *et al.* Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease [J]. *Nutrients*, 2012, 4(11):1552-1553.
- [8] Wu S G, Tian J Y, Gatesoupe F J, *et al.* Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing [J]. *Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(9):1585-1595.
- [9] Reid H I, Treasurer J W, Adam B, *et al.* Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae [J]. *Aquaculture*, 2009, 288(1-2):36-43.
- [10] Moran D, Turner S J, Clements K D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus* [J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(4):590-597.
- [11] 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, 91:106-113.
- [12] Wu G F, Li W G, Gao W K, *et al.* PCR-DGGE principle and its analysis in animal intestinal tract [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary*, 2008, 35(6):37-39 [吴高峰,李文刚,高卫科,等. PCR-DGGE的原理及在动物肠道菌群分析中的应用. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(6):37-39.]
- [13] Wang S Y. A generation of high throughput sequencing and its application prospect in clinical [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2010, 31(3):269-272. [王升跃. 新一代高通量测序技术及其临床应用前景. *广东医学*, 2010, 31(3):269-272.]
- [14] Li X R. Using ribosomal RNA pyrosequencing to explore the microbial community structure [D]. Shanghai:Fudan University, 2011. [李晓然. 基于核糖体RNA高通量测序分析微生物群落结构. 上海:复旦大学, 2011.]
- [15] Segata N, Haake S K, Mannon P, *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples [J]. *Genome Biology*, 2012, 13(6):R42.
- [16] Thomas S P. Metatranscriptomics of the human gut microbiome [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(suppl. 1):I15.
- [17] Kuczynski J, Costello E K, Nemergut D R, *et al.* Direct sequencing of the human microbiome readily reveals community differences [J]. *Genome Biology*, 2010, 11(5):210.
- [18] Flint H J, Bayer E A, Rincon M T, *et al.* Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2):121-131.
- [19] Gita H, Fushino T, Oshima K, *et al.* Microflora in the water and sediment of freshwater culture ponds [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985, 51(1):91-97.
- [20] Sakata T, Sugita H, Mfitsuoka T, *et al.* Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of freshwater fish [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1980, 46(10):1249-1255.
- [21] Qin Y X, Wang X L, Yan Q P, *et al.* Study on the intestinal microflora of *Epinephelus awoara* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5):18-23. [覃映雪,王晓林,鄢庆彬,等. 青石斑鱼肠道菌群研究. *海洋水产研究*, 2007, 28(5):18-23.]
- [22] Tanaasomwang V, Maroga K. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takrfugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larve and juvenile stages [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1989, 55(8):1371-1377.
- [23] Bairagi A, Sarkar Ghosh K, Sen S K, *et al.* Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35:436-446.
- [24] Shen Y. Studies on the digestive system and digestive enzymes of four species in sliuriformes [D]. Haerbin:Northeast Forestry University, 2007. [沈怡. 四种鲆形目鱼消化系统及消化酶的研究. 哈尔滨:东北林业大学, 2007.]
- [25] Wang F I, Chen J C. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to

- Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress [J]. *Aquaculture*, 2006, 258 (1 - 4): 34 - 41.
- [26] Asfie M, Yanag H, Okano R, *et al.* The protease-producing ability of *Vibrios* isolated from larvae and juveniles of Japanese flounder [J]. *Aquaculture Science*, 2000, 48(1): 139 - 140.
- [27] Hamid A, Sakata T, Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of grey mullet: A comparison of mullet intestinal microflora in fresh and sea water [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1978, 44: 53 - 57.
- [28] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish [J]. *Microbial Ecology*, 1999, 38: 1 - 26.
- [29] Ni D S, Wang J G. *Biology and diseases of grass carp* [M]. Beijing: Science Press, 1999. [倪达书, 汪建国. 草鱼生物学与疾病. 北京: 科学出版社, 1999.]
- [30] Li S F, Yang He Q, Lu W M. Preliminary research on diurnal feeding rhythm and the daily ration for silver carp, bighead carp and grass carp [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1980, 4(3): 275 - 283. [李思发, 杨和荃, 陆伟民. 鲢、鳙、草鱼摄食节律和日摄食率的初步研究. 水产学报, 1980, 4(3): 275 - 283.]
- [31] Longeon A, Peduzzi J, Barthelemy M, *et al.* Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153 [J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(6): 633 - 641.
- [32] Gordon J, Nikhil D. Scientists link weight to gut bacteria [N]. *China Daily*, 2006 - 12 - 22(7).
- [33] Yoshimizu M, Kimura T, Sakai M. Studies on the intestinal microflora of artificial transplanting from fresh water into sea water [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1976, 42(8): 863 - 873.

## Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond- and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LI Cunyu<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>, LIU Xuezhou<sup>1\*</sup>, YANG Hongjun<sup>3</sup>,  
SHI Bao<sup>1</sup>, SHI Xueying<sup>1,2</sup>, ZHU Xuewu<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China;

3. Rizhao Water Conservancy Fish Farm, Rizhao 276805, China)

**Abstract:** In order to investigate the intestinal bacterial community comparison and its relationship with environmental factors, intestine samples were collected from pond and indoor tank-cultured Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and the composition, diversity and origin of bacterial community in them were investigated based on high throughput sequencing of 16S rRNA gene and six other samples from culture-associated environmental factors including culture water, feeds and pond sediment was also collected and their microbiota composition was also investigated using sequencing of 16S rRNA gene. The results showed that the dominant bacterial community harboring in pond-culture Japanese flounder intestine were Firmicutes (30.49%), Proteobacteria (19.16%), Fusobacteria (11.11%), wherein the most abundant bacteria was *Bacillus* (27.66%) and the least abundant was *Vibrio* based on genus level; whereas for pond-culture Japanese flounder, its intestine holds a core microbiota composed of Proteobacteria (44.31%), Firmicutes (11.57%), Actinobacteria (4.79%), in which the most abundant bacteria were *Acinetobacter* and *Vibrio* based on genus level. The most abundant bacterial operational taxonomic units (OTUs) in the Japanese flounder intestinal content are those related to nutrition metabolism, and the potential pathogens and probiotics are also important members of the intestinal microbiota. Differences and phylogenetic analysis revealed that the composition, diversity and origin of Japanese flounder intestinal bacterial communities were closely related with feed, followed by culture water. The present results would not only facilitate production of high-efficient probiotics, but also could provide theoretical support for construction of practical micro-ecological technology for *P. olivaceus* under different culture environment.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; intestinal bacterial community; 16S rRNA; MiSeq high throughput sequencing

**Corresponding author:** LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn