

文章编号: 1000-0615(2019)05-1317-09

DOI: 10.11964/jfc.20180411227

健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群结构的差异

熊向英¹, 王贤丰², 彭银辉³, 王志成^{1*}

(1. 广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000;

2. 北海市海城区国家海域动态监管中心, 广西北海 536000;

3. 北部湾大学海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西钦州 535011)

摘要: 为研究病害发生后卵形鲳鲹肠道菌群结构的差异及其与养殖环境的关系, 分析不同样品中的菌群组成和细菌多样性。实验采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术和生物信息学分析手段, 分别构建了健康鱼水样、患病鱼水样、健康鱼肠道、患病鱼肠道和饵料颗粒5个样品中菌群的 16S *rRNA* 基因测序文库。研究表明, 与健康鱼肠道细菌组成相比, 患病鱼肠道中螺旋体门相对丰度显著升高, 厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度显著降低; 患病后肠道中的细菌种类仅为健康鱼肠道细菌种类总数的 54.94%; 健康卵形鲳鲹肠道菌群中有 73.46% 的可操作分类单元(OTUs)与水体样品中 OTUs 一致, 有 70.58% 与饲料样品一致, 而患病后分别只有 17.98% 和 38.95% 的 OTUs 与水体和饲料样品一致。健康卵形鲳鲹肠道中黑海弧菌的相对丰度为 17.19%, 患病后该菌的相对丰度大幅提高, 达到 78.90%; 健康鱼肠道中鳕发光杆菌占比 54.53%, 患病鱼肠道中不含鳕发光杆菌。健康和患病鱼肠道菌群种类组成类似, 但存在一定差异, 病害的发生会导致肠道细菌多样性显著降低。健康鱼肠道菌群与养殖环境和颗粒饲料中菌群组成关系密切, 而患病后鱼肠道细菌多样性受环境中菌群的影响较小。黑海弧菌在患病鱼肠道中的大量增殖可能是引起其患病的重要原因。

关键词: 卵形鲳鲹; 肠道; 养殖水体; 菌群; 高通量测序

中图分类号: S 945.4; Q 786

文献标志码: A

卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*), 俗称金鲳, 是一种暖水性中上层鱼类, 广泛分布于印度洋、太平洋和大西洋的温带及热带海域^[1]。因卵形鲳鲹能在中国南方地区顺利越冬, 且适盐范围广(3~33)^[2]、生长速率较快、出口加工市场前景诱人等特点, 近年来已逐渐成为广西、广东、海南等地海水网箱养殖主要品种之一。当前卵形鲳鲹养殖模式绝大多数采用高密度近海网箱养殖, 随着该养殖产业的快速发展和无序扩张, 使得海区负荷过大, 养殖环境不断恶化, 卵形鲳鲹细菌病的发生越来越频繁。本实验室于

2015—2017年对广西北海网箱养殖卵形鲳鲹的病害调查中发现, 其在养殖过程中长期受细菌疾病的困扰, 表现症状为肠道内有大量黄白色脓状物、脑干发红、鳃盖出血, 部分病鱼眼球突出^[3]。

鱼类肠道中存在大量的微生物, 构成了鱼类肠道微生物区系, 这些微生物群落是动物长期进化的结果, 对机体的免疫功能、营养需求等方面具有重要作用。当鱼类处于健康状态时, 肠道菌群间会形成相对稳定的动态平衡^[4-5], 而这种平衡一旦被打破, 致病菌异常增殖, 正常

收稿日期: 2018-04-04 修回日期: 2018-09-18

资助项目: 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139088); 广西科学院基本科研业务费专项(15YJ22HYS14); 广西科技计划项目(AB16380167, AB18221112); 广西创新驱动发展专项(AA17204044); 北海市科技计划项目(201884028); 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室自主项目(2019ZB07)

通信作者: 王志成, E-mail: WZC66666@126.com

菌群的生长受到抑制, 宿主就会因肠道菌群紊乱而发生疾病。对于水生动物而言, 鱼类肠道菌群结构还与养殖水环境、饵料等关系密切。因此, 对养殖鱼类肠道菌群结构有比较全面的认识, 并对其与养殖水体和饵料相关性进行研究, 对防止细菌性疾病的暴发具有重要意义。

目前, 对卵形鲳鲹细菌病的研究多集中于个别病例的病原分离鉴定^[6-9], 而对病害发生时养殖鱼类肠道菌群结构的变化还未见报道。基于16S *rDNA*扩增子测序的高通量测序技术能全面解析微生物群落中细菌种类和数量, 在微生物群落结构的研究方面得到广泛应用^[10]。本研究拟通过基于Illumina HiSeq测序平台的高通量测序手段, 对网箱养殖的健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群的变化以及与养殖环境的相关性进行分析, 为卵形鲳鲹的健康养殖以及病害防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

样品于2017年9月10日采自广西北海铁山港2个日常管理相同的卵形鲳鲹养殖网箱, 分别为A和B网箱。A网箱中的卵形鲳鲹未出现肉眼可见的症状, 作为健康用鱼取样; B网箱卵形鲳鲹有脑干发红、鳃盖出血、肠道中有大量脓液等肉眼可见病症, 作为患病鱼取样; 同时取样样品还包括养殖水体和饵料。健康鱼和患病鱼各随机选取5条, 体质量为165~318 g/尾, 用无菌采样袋收集适量颗粒饲料, 同时在水深6 m处取水样3 L, 混合均匀后装入灭菌容器。将采集的卵形鲳鲹、水样以及饵料置于冰盒中运回实验室处理。

健康鱼和患病鱼水样为同一海域不同网箱中的水。健康鱼水样样品标记为W1, 患病鱼水样样品标记为W2, 健康鱼肠道样品标记为H, 患病鱼肠道样品标记为D, 饵料颗粒样品标记为F。

1.2 样品总DNA提取、PCR扩增及高通量测序

卵形鲳鲹置于解剖盘中, 用酒精对其体表进行消毒, 在无菌环境中解剖取其肠道, 并用无菌海水冲洗3次后置于灭菌的离心管, 5条卵形鲳鲹的肠道混合成一个样本。称取0.5g颗粒饵料于无菌离心管中, 加入少量的无菌水。用组织匀浆机分别对卵形鲳鲹肠道样品和颗粒饵料匀浆后, 采用Soil DNA Kit试剂盒(Omega Bio-Tek,

USA)提取细菌总DNA。将1 L水样先经5 μm孔径的混合纤维膜预过滤, 去除杂质后用0.22 μm无菌聚醚砜膜(天津市津腾实验设备有限公司)进行抽滤, 将带有水体微生物宏基因组的滤膜剪碎, 用E. Z. N. A Water DNA Extraction Kit试剂盒(Omega Bio-Tek, USA)提取。对16S *rDNA*基因可变区(V3~V4区)进行PCR扩增, 所用引物序列为细菌特异性引物: 341F (5'-CCTAYGGGRBG-CASCAG-3')和806R (5'-GGACTACNNGGATCTAAT-3')。PCR产物使用浓度为2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 送北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行基于Illumina HiSeq测序平台的高通量测序。

1.3 数据分析

测序数据处理 根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据, 截去Barcode和引物序列后, 使用FLASH v 1.2.7软件对每个样品的reads进行拼接、过滤得到高质量的tags数据, 然后利用Qiime v 1.7.0软件与数据库(Gold database)比对(UCHIME Algorithm)检验并去除嵌合体序列, 得到有效数据(effective tags)。

OTU聚类 and 物种注释 利用Uparse软件 v 7.0.1001对所有样品的全部effective tags进行聚类, 默认以97%的一致性identity将序列聚类成为可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 同时选取OTUs的代表性序列, 用Mothur方法与SILVA的SSUrRNA数据库对其进行物种注释分析, 每个OTU在结果分析中视作一种细菌。使用MUSCLE v. 3.8.31软件进行快速多序列比对, 得到所有OTUs代表序列的系统发生关系。为了去除样品序列差异引起的误差, 对所有样品进行均一化处理(以数据量最少的样品为标准, cut off=69 713), 以处理后的数据为基础进行后续多样性分析。

样品复杂度分析 利用Qiime软件v 1.9.1计算Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、Goods-coverage指数, 使用R软件v 2.15.3绘制稀释曲线并进行Alpha多样性指数组间差异分析。

2 结果

2.1 基于16S *rRNA*测序的细菌多样性分析

5个样品所测得的原始数据共385 307条, 过滤低质量、长度短以及嵌合体后, 获得用于后续

分析的有效序列315 245条。各样品测序深度均在99%以上, 说明本次测序较好地覆盖了菌群的多样性。以97%相似性水平划分OTU, W1、W2、H、D及F样品中有效OTUs数目分别为454、458、486、267和645个, H样品中细菌种类与养殖水体中的细菌种类数量差异不大, 但D中细菌种类明显少于水体中的细菌种类。从Shannon、Chao1和系统发育多样性指数可知, D样品中的菌群多样性(表1)、菌群丰度和系统发育多样性均最低, H样品中的系统发育多样性最高, F样品中菌群丰度最高(表1)。

等级分布曲线在水平方向上的跨度表示样品中细菌多样性的丰富程度, 在垂直方向的平滑程度反映了样品中细菌分布的均匀程度。结果显示, 颗粒饵料中细菌多样性高于肠道和水体样品中的细菌多样性; 同时在垂直方向上, 患病鱼、健康鱼和饵料颗粒样品的曲线比其他

样品陡峭, 表明样品中存在相对丰度明显占优的细菌种类(图1)。

2.2 各样品中细菌多样性及相关性分析

以各样品中分布的有效OTUs数为计算依据, 用MOTHUR软件中venn命令对各样品中菌群菌种的多样性进行分析, 构建韦恩图, 结果显示, 所有样品共有的OTUs为27个, W1、W2、H、D和F样品特有的OTUs分别为15、19、43、147和176个。其中患病鱼肠道细菌种类较健康鱼少了219个OTUs, 仅占健康鱼的54.94%, H和D的肠道共有51个OTUs, 健康鱼有89.51%的OTUs未在患病鱼的肠道中检测到, D样品中细菌多样性下降明显。进一步分析肠道细菌种类多样性与环境及颗粒饲料中的细菌多样性之间的相关关系发现, H样品中有73.46%的OTUs与其养殖水体W1中OTUs一致, 有70.58%与F样品中一致, 仅有

表1 各样品高通量测序结果分析

Tab. 1 Analysis of the high-throughput sequencing results

样品 sample	有效OTUs effective OTUs	Shannon 指数 Shannon index	菌群丰度 Chao1 index	系统发育多样性 phylogenetic diversity index	测序深度 goods coverage
健康鱼水样(W1) healthy fish water	454	5.371	488.080	43.666	0.998
患病鱼水样(W2) diseased fish water	458	5.178	521.000	41.006	0.998
健康鱼肠道(H) healthy fish intestine	486	3.472	515.528	76.370	0.998
患病鱼肠道(D) diseased fish intestine	267	1.548	293.233	38.915	0.999
饵料颗粒(F) pellet feed	645	3.567	736.438	71.766	0.997

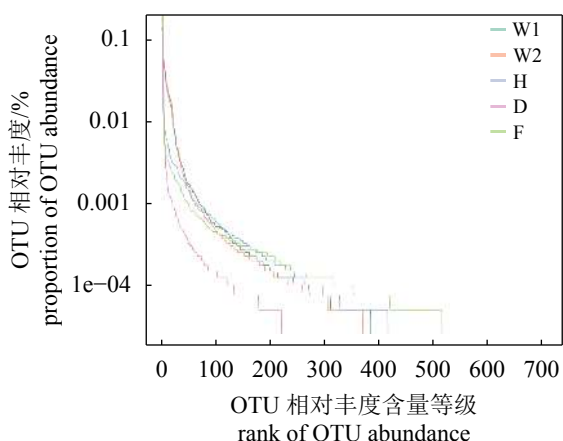


图1 各样品中细菌多样性的等级分布曲线

Fig. 1 Rank-abundance curves based on the OTU species number in each sample

13.79%的OTUs与养殖水体和颗粒饲料中的菌群均无关, 而患病后只有17.98%的OTUs与其养殖水体W2一致, 有38.95%与颗粒饲料一致, 58.05%的OTUs与水体和饵料中菌群无关(图2)。健康卵形鲳鲹的肠道菌群结构与养殖环境和饵料中菌群组成关系密切, 而卵形鲳鲹患病后其肠道细菌多样性与环境中的菌群差异较大。

进一步通过主成分分析样品间的差异, 结果显示, PC1轴对样品的贡献率为38.65%, PC2轴对样品的贡献率为30.45%, 健康卵形鲳鲹肠道和水样的距离较近, 患病卵形鲳鲹肠道和颗粒饲料与其他样品相距较远, 说明健康卵形鲳鲹肠道的微生物群落组成与水体更相似(图3)。

2.3 各样品细菌群落组成及相对丰度

在门分类水平上, W1和W2样品的细菌群落

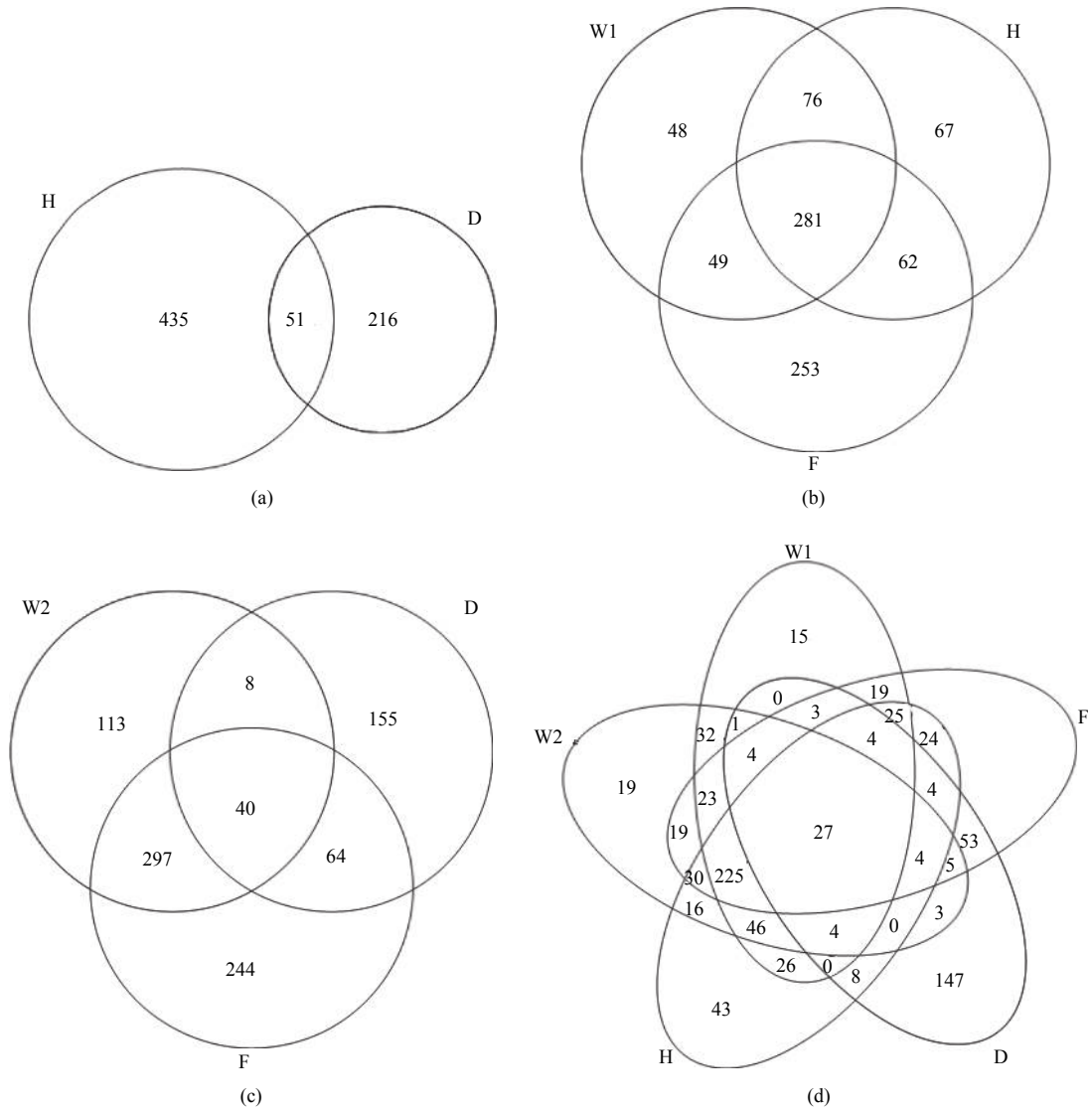


图 2 不同样品中细菌数目的venn分析

图中数字为各样本OTUs数量

Fig. 2 Venn analysis in different samples

The number in figure indicates the OTUs in different samples

组成类似，相对丰度占前3位的分别为变形菌门 (Proteobacteria)(57.40% vs. 54.88%)、放线菌门 (Actinobacteria)(32.34% vs. 36.15%)和拟杆菌门 (Bacteroidetes)(5.15% vs. 4.26%)。变形菌门在H和D样品中相对丰度均最高，分别为84.96%和82.65%，差异较大的螺旋体门(Spirochaetes)在D样品中的丰度为11.03%，远高于其在H样品的丰度(0.04%)；而厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门则相反，其在H样品中占比分别为7.64%和2.57%，在D样品中则为2.22%和0.90%，二者相对丰度H样品要高于D样品。颗粒饲料与水体和肠道的细菌群落组成不同，蓝细菌门(Cyanobacteria)的相对丰度最高，

为58.00%，其次为变形菌门(30.4%)和厚壁菌门(7.28%)。研究表明，变形菌门是健康和患病卵形鲳鲹养殖水体和肠道的最主要优势菌，而颗粒饵料中的最主要优势菌群是蓝细菌门，放线菌门在养殖水体中占比较大，在肠道和颗粒饲料样品中占比却很小(图4)。

从各样品中菌群丰度高于1%的OTUs进一步分析菌群结构，H样品中有2种细菌的相对丰度超过1%，分别为鳗发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*)(54.54%)、黑海弧菌(*Vibrio ponticus*)(17.20%)；D样品中则只有黑海弧菌，占比达到78.92%，其余细菌均小于1%；而W1和W2样品菌群结构类似，

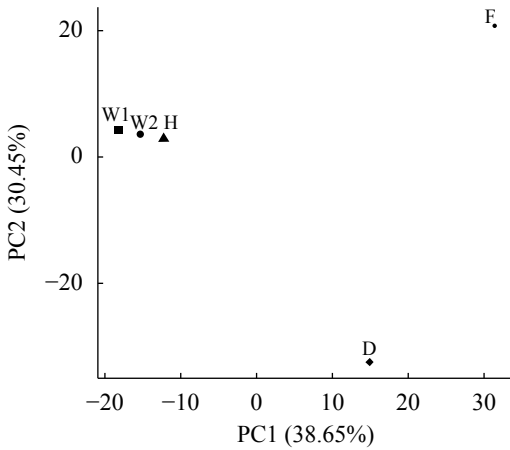


图3 主成分分析不同样品群落结构

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of the bacterial community between different samples

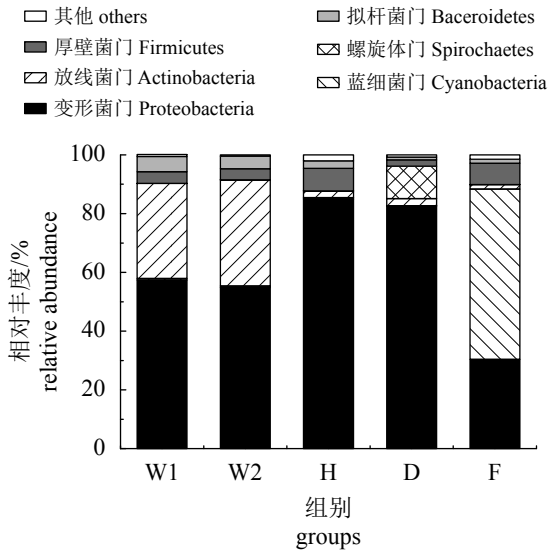


图4 基于门水平的各样品菌群相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of phylum-level bacterial communities in different samples

相对丰度高于1%的细菌为Alpha变形菌HIMB114 (*Alpha proteobacterium* HIMB114)(6.40% vs. 5.84%)、Alpha变形菌HIMB59 (2.38% vs. 2.40%)和遍在远洋杆菌(*Pelagibacter ubique*)(1.96% vs. 1.48%); 饵料中相对丰度高于1%的细菌有2种, 分别为 *Phaeolus vulgaris* (42.70%)和 *Phyllostachys praecox* (20.62%), 表明各样品中均只有少数几种细菌为优势菌(表2)。

3 讨论

鱼类肠道菌群的动态变化与其健康状况密

切相关, 同时受外部环境中的菌群结构影响。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^[11]。本研究通过基于16S *rRNA*基因片段的高通量测序分别分析了健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群结构差异及其与颗粒饲料、水环境等的关系, 深入了解网箱养殖卵形鲳鲹的微生态生境特征, 以期对卵形鲳鲹的健康养殖和疾病防控提供理论基础。

研究表明, 健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群种类组成类似但也有差异, 最主要优势菌群均为变形菌门。与健康鱼肠道细菌组成相比, 患病鱼肠道中螺旋体门相对丰度显著增加, 厚壁菌门和拟杆菌门含量显著减少。同时患病鱼肠道中的细菌种类仅为健康鱼肠道细菌种类总数的54.94%, 健康鱼有89.51%的OTUs未在患病鱼的肠道中检测到, 表明疾病的发生导致卵形鲳鲹肠道中细菌种类的改变, 且细菌多样性明显降低。有研究发现, 健康、亚健康、患病斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)的肠道菌群种类类似, 但相对丰度比例具有一定的差异^[12]。张正等^[13]研究同样发现, 发病半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)和健康鱼肠道中优势菌群的结构差异不明显, 但病鱼肠道中细菌多样性下降非常明显。

鱼类肠道菌群的形成主要与鱼卵表面、饵料和养殖水体中的细菌有关, 其中颗粒饲料和水环境对肠道菌群的影响较大^[14-15]。有研究表明, 水体及颗粒饲料中的细菌群落与鱼类消化道中的菌群结构密切相关, 如池塘和工厂化2种养殖条件下牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的肠道菌群结构与颗粒饲料中菌群关系密切, 其次受养殖水环境中菌群影响较大^[16]; 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肠道中的优势菌在相应的养殖水体中同样是优势菌^[17]; 长期投喂人工配合饵料的大西洋鳕(*Gadus morhua*)其消化道菌群结构发生明显的改变^[18]。但也有许多学者认为鱼类肠道菌群具有一定的独立性, 与环境及颗粒饲料中的细菌群落组成不相关, 张正等^[19]研究发现, 池塘养殖半滑舌鲷消化道菌群多样性及菌群组成结构与养殖水体中的群落结构明显不同, 而颗粒饲料中的细菌对其消化道菌群结构的影响有限; 希腊学者在对该国不同的鱼类养殖厂进行持续20个月的研究中发现, 所养殖鱼类的消化道菌群和养殖水体的菌群并不相关^[20]。本研究中健

表2 各样品中细菌相对丰度高于1%的OTUs

Tab. 2 Relative abundance exceeding 1% bacterial OTUs in different samples

组别 groups	相对丰度/% percentage of OTU	物种注释结果 classification results	组别 groups	相对丰度/% percentage of OTU	物种注释结果 classification results
H	54.54	鳃发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	D	78.92	黑海弧菌 <i>V. ponticus</i>
	17.20	黑海弧菌 <i>V. ponticus</i>			
W1	6.40	alpha变形菌HIMB114 <i>A. proteobacterium</i> HIMB114	W2	5.84	alpha变形菌HIMB114 <i>A. proteobacterium</i> HIMB114
	2.38	alpha变形菌HIMB59 <i>A. proteobacterium</i> HIMB59			
	1.96	遍在远洋杆菌 <i>P. ubiqua</i>			
F	42.70	<i>P. vulgaris</i>	F	20.62	<i>P. praecox</i>

康卵形鲳鲈肠道菌群中有73.46%的OTUs与水体中OTUs一致,有70.58%与颗粒饵料中一致,只有13.79%的OTUs与养殖水体和颗粒饲料中的菌群均无关,而患病后卵形鲳鲈肠道细菌只有17.98%的OTUs与水体一致,有38.95%与颗粒饲料一致,58.05%的OTUs与水体和颗粒饲料中菌群均无关,同时PCA图显示,健康鱼肠道的群落组成与水样更相似,表明健康卵形鲳鲈的肠道菌群与养殖环境和颗粒饲料中的菌群组成关系密切,而患病后卵形鲳鲈肠道细菌多样性受环境和颗粒饲料中细菌的影响较低。在饲料相同且水环境相差不大的情况下,造成这种差异的原因可能是患病卵形鲳鲈肠道内菌群失衡,条件致病菌异常增殖,抑制肠道内正常菌群的生长。

有学者通过统计发现,几乎所有海水鱼肠道优势菌群均有弧菌^[21]。弧菌属的多数种类是水产养殖动物的重要致病菌,但也有研究显示了弧菌对宿主有益的一面,如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^[22]。Asfie等^[23]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促进作用,证实弧菌作为优势菌的重要调节作用。本研究中健康卵形鲳鲈肠道中黑海弧菌的相对丰度有17.20%,患病鱼中黑海弧菌的相对丰度则大幅提高,达到78.92%。黑海弧菌于2004年首次分离自西班牙海水、贻贝和患病的金头鲷(*Sparus aurata*)中^[24],经鉴定被认为是弧菌属的一个新种,而后据报道被认为是花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[25]和棘颊雀鲷(*Premnas biaculeatus*)仔鱼的病原菌^[26]。最近有研究表明,黑海弧菌是造成海南地区网箱养殖卵形鲳鲈大

规模死亡的致病菌,大约有50%的卵形鲳鲈感染该菌,症状为鱼体肿胀、肝脏和脾脏充血、肠道有淡黄色溢出物、背鳍和尾鳍出现不同程度的溃烂^[27]。鱼类肠道菌群在正常条件下处于动态平衡,维持着鱼肠道正常的生理功能,但当平衡遭到破坏时,病原菌或条件致病菌异常增殖导致鱼病的发生。由此推断,黑海弧菌在患病卵形鲳鲈肠道中的相对丰度大幅提高可能是引起其患病的重要原因。另外健康卵形鲳鲈肠道中鳃发光杆菌占比54.54%。发光细菌主要分布在海洋环境中,经过调查,鳃发光杆菌在中国沿海海域自南到北皆有分布^[28-29]。该菌在卵形鲳鲈肠道中检出,说明其能在海洋动物体内定殖,但该菌在卵形鲳鲈肠道中具有怎样的作用,目前还无从知晓,能否可以作为益生菌的候选菌株,有待深入研究。

参考文献:

- [1] 周永灿,朱传化,张本,等.卵形鲳鲈大规模死亡的病原及其防治[J].海洋科学,2001,25(4):40-43.
Zhou Y C, Zhu C H, Zhang B, et al. Isolation and prevention of the pathogen causing large scale death on *Trachinotus ovatus*[J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(4): 40-43(in Chinese).
- [2] Li G F, Zhao D H, Huang L, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 17-25.
- [3] 熊向英,黄国强,王志成,等.广西卵形鲳鲈海豚链球菌基因分型、耐药谱型以及毒力基因检测[J].水产学报,2018,42(4):586-595.
Xiong X Y, Huang G Q, Wang Z C, et al. Molecular

- typing, antibiogram type and detection of virulence genes of *Streptococcus iniae* strains isolated from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi Province[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(4): 586-595(in Chinese).
- [4] 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.
- [5] De Schryver P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2360-2368.
- [6] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 等. 卵形鲳鲹结节病原的分离与鉴定[J]. *广东海洋大学学报*, 2008, 28(4): 49-53.
Huang Y C, Jian J C, Wu Z H, *et al.* Isolation and identification of the pathogen causing sarcoidosis of *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2008, 28(4): 49-53(in Chinese).
- [7] 王瑞旋, 刘广锋, 王江勇, 等. 养殖卵形鲳鲹诺卡氏菌病的研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2010(1): 52-58.
Wang R X, Liu G F, Wang J Y, *et al.* Studies on nocardiasis infected farming *Trachinotus ovatus*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010(1): 52-58(in Chinese).
- [8] 王瑞旋, 冯娟, 苏友禄, 等. 卵形鲳鲹美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 1020-1027.
Wang R X, Feng J, Su Y L, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and its drug sensitivity[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(5): 1020-1027(in Chinese).
- [9] Cai X H, Peng Y H, Wang Z C, *et al.* Characterization and identification of streptococci from golden pompano in China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 207-217.
- [10] 孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 393-400.
Sun X, Gao Y, Yang Y F. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 393-400(in Chinese).
- [11] 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.
- [12] 许燕, 王印庚, 张正, 等. 不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群的结构差异[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 388-398.
Xu Y, Wang Y G, Zhang Z, *et al.* Variance analysis of bacterial community in the intestine of cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 388-398(in Chinese).
- [13] 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).
- [14] Paerl H W, Dyble J, Moisander P H, *et al.* Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(3): 233-246.
- [15] 罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的PCR-DGGE分析[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(2): 49-53.
Luo P, Hu C Q, Xie Z Y, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, 25(2): 49-53(in Chinese).
- [16] 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).
- [17] 周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 613-617.
Zhou J M, Wu Z X, Zeng L B, *et al.* Microflora in digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(5): 613-617(in Chinese).
- [18] Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, *et al.* Characteris-

- ation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(3): 829-841.
- [19] 张正, 李彬, 王印庚, 等. 基于高通量测序的池塘养殖半滑舌鳎消化道菌群的结构特征分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 38-45.
Zhang Z, Li B, Wang Y G, *et al.* The microflora structure in digestive tract of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) cultured in outdoor pond basing on high-through sequencing technique[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 38-45(in Chinese).
- [20] Alexopoulos A, Plessas S, Voidarou C, *et al.* Microbial ecology of fish species on-growing in Greek sea farms and their watery environment[J]. *Anaerobe*, 2011, 17(6): 264-266.
- [21] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish[J]. *Microbial Ecology*, 1999, 38(1): 1-26.
- [22] Hamid A, Sakata T, Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of gray mullet-II: a comparison of the mullet intestinal microflora in fresh and sea water[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1978, 44(1): 53-57.
- [23] Asfie M, Yanagi 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.
- [24] Macián M C, Garay E, Grimont P A D, *et al.* *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. furnissii* clade, isolated from gilthead sea bream, mussels and seawater[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(5): 535-540.
- [25] Xie Z Y, Hu C Q, Zhang L P, *et al.* Identification and pathogenicity of *Vibrio ponticus* affecting cultured Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier in Cuvier and Valenciennes)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(1): 62-67.
- [26] Kim J S, Rho S, Kang B J. Characterization of *Vibrio ponticus* KJS1 isolated from larvae of maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*[J]. *Journal of Fish Pathology*, 2007, 20(1): 25-31.
- [27] Liu S B, Li E C, Cai Y, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity characterization of *Vibrio ponticus* from the golden pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2018, 496: 285-290.
- [28] 沈建伟, 杨颐康. 黄海发光细菌的分离鉴定[J]. 海洋与湖沼, 1987, 18(4): 333-340.
Shen J W, Yang Y K. The isolation and identification of marine luminous bacteria from the waters of the Huanghai Sea (Yellow Sea)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1987, 18(4): 333-340(in Chinese).
- [29] 沈建伟, 朱文杰, 吴自荣, 等. 南海中国沿海发光细菌的分离鉴定[J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(1): 76-80.
Shen J W, Zhu W J, Wu Z R, *et al.* The isolation and identification of marine luminous bacteria from the waters of the South China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1988, 19(1): 76-80(in Chinese).

Variance analysis of intestinal bacterial community between healthy and diseased *Trachinotus ovatus*

XIONG Xiangying¹, WANG Xianfeng², PENG Yinhui³, WANG Zhicheng^{1*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China;

2. National Sea Area Dynamic Supervising Center of Haicheng Beihai, Beihai 536000, China;

3. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences-Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

Abstract: In order to investigate the difference of the intestinal community structure and its relationship with environmental factors in response to disease, the intestines of healthy and diseased *Trachinotus ovatus* were used to analyze the bacterial community composition and diversity as well as the culture waters and pellet feed. The five samples were studied by using Illumina HiSeq high-throughput sequencing and biological information analysis method. Compared with the intestinal microflora of the healthy pompano, the relative abundances of Spirochaetes significantly increased in the diseased pompano, whereas, the Firmicutes and Bacteroidetes exhibited an opposite pattern. The bacteria species in diseased pompano intestine only accounted for 54.94% in healthy pompano. There was 73.46% of the OTUs in the healthy ovate intestine, the same as that in the culture waters, and 70.58% in the feed, while the percentage dropped to 17.98% and 38.95% in the diseased pompano. Notably, the disease pompano had a higher relative abundance of *Vibrio ponticus* than healthy pompano being 78.90% and 17.19%, respectively. In addition, the relative abundance of *Photobacterium leiognathi* in healthy pompano was 54.53%, but absent in diseased pompano. The intestinal bacterial composition was relatively stable but there were still some difference between healthy and diseased pompano. After the occurrence of disease, the bacterial diversity declined markedly. The culture water and feed had a close correlation with the healthy pompano intestine but low influence on diseased pompano in bacterial species composition.

Key words: *Trachinotus ovatus*; intestine; culture waters; bacterial community; high-throughput sequencing

Corresponding author: WANG Zhicheng. E-mail: WZC66666@126.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Guangxi Province, China (2015GXNSFAA139088); Basic Scientific Research Foundation of Guangxi Academy of Sciences (15YJ22HYS14); Guangxi Science and Technology Plan Projects (AB16380167, AB18221112); Guangxi Innovation Driven Development Fund Project (AA17204044); Beihai Science and Technology Plan Projects (201884028); Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation (2019ZB07)