

## 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

许燕<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2\*</sup>, 张正<sup>2</sup>, 姜燕<sup>2</sup>,  
廖梅杰<sup>2</sup>, 李彬<sup>2</sup>, 王凯<sup>1,2</sup>, 李文生<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

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;

3. 莱州明波水产有限公司, 山东烟台 261418)

**摘要:** 为了研究不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群结构的差异及其与养殖环境中菌群结构的相关性, 采用Illumina HiSeq PE250高通量测序的方法对健康、亚健康、典型黑身病和口服氟苯尼考条件下的斑石鲷肠道、养殖水体和颗粒饵料中的细菌多样性及群落结构进行了分析比较。结果显示, 养殖水体中细菌多样性高于肠道和颗粒饵料。不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道中细菌均以变形菌门、厚壁菌门和软壁菌门为主, 且对应的操作分类单元(OTU)占样品全部OTU的比例均达到85%以上。黑身病的发生可影响斑石鲷肠道中丰度最高的前20种优势细菌种类的排名次序, 其中变形菌门中的弧菌属的相对丰度显著增加, 且随着弧菌属丰度的增加, 斑石鲷的黑身病症状也逐渐加重。饵料中添加氟苯尼考投喂斑石鲷能使患病鱼肠道弧菌属的丰度从60.33%下降到1.29%, 较大程度改变了肠道的菌群结构, 并证实氟苯尼考有效防治黑身病。其次, 养殖水体和颗粒饵料对斑石鲷肠道菌群也有一定影响, 且养殖水体的影响高于颗粒饵料。本研究首次报道了斑石鲷肠道菌群结构, 其研究结果为今后斑石鲷的健康养殖、疾病防控及其微生态学研究提供了参考依据和技术支撑。

**关键词:** 斑石鲷; 黑身病; 氟苯尼考; 肠道菌群; 高通量测序; 操作分类单元(OTU)

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)隶属于鲈形目(Perciformes), 石鲷科(Oplegnathidae), 石鲷属(*Oplegnathus*), 主要分布于朝鲜、日本以及中国黄海、东海、南海等海域, 属温热带近海沿岸中下层鱼类<sup>[1-2]</sup>。斑石鲷因体态优美、肉质细腻、胶原蛋白丰富、富含多种氨基酸与不饱和脂肪酸、能够治疗脾肾虚寒等具有较高的观赏、食用和药用价值<sup>[3-4]</sup>。2014年国内首次突破斑石鲷生殖调控及苗种生产技术, 并人工驯养繁殖成功, 为斑石鲷在我国沿海地区的养殖推广

奠定了基础<sup>[5]</sup>。目前, 斑石鲷已经在我国山东、福建、广东及海南等沿海地区初步形成一定规模的养殖。

经过2~3年的养殖实践, 斑石鲷在高密度集约化养殖模式下, 黑身病已成为较普遍的问题, 给斑石鲷养殖业带来了困扰和一定的经济损失。2015年12月, 山东某养殖场暴发了斑石鲷黑身病, 患病鱼前期表现为游泳离群、活力差、摄食减少、体色略黑; 随着病情加重, 体色变黑, 鱼体逐渐消瘦, 最后沉底死亡。解剖

收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-04-25

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD17B03); 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHXX2A0801)

通信作者: 王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

发现病鱼腹腔内有大量无色或淡黄色积水;肠壁变薄、透明,肠道充水;肝脏严重充血、易碎;肾脏、脾脏充血;胆囊萎缩;鳃丝出血黏连。该病发病率极高,累计死亡率高达50%~90%。病鱼约7月龄,水温20℃左右。基于该症状的特征,将其命名为黑身病。对患病鱼的各个内脏器官进行细菌分离发现,病鱼各个内脏器官均存在一种优势菌——哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),其中以肠道居多。通过人工感染实验发现,该优势菌种是斑石鲷黑身病的致病原。对病原菌完成了药敏实验,筛选出了抗生素氟苯尼考为高度敏感药物,由此对患病斑石鲷进行了氟苯尼考口服治疗。氟苯尼考作为水产养殖中常用的抗菌药物,具有抗菌谱广、吸收迅速等特点,且多数水产动物致病菌对氟苯尼考都较为敏感,因而常用于多种养殖细菌性疾病的治疗<sup>[6-7]</sup>。

肠道菌群是附着在肠道黏膜上的一个复杂多样的生态系统结构,在肠道中保持着一种动态的平衡,并在消化吸收营养物质、调节宿主免疫功能、抵御有害微生物侵害等方面具有重要作用<sup>[8-10]</sup>。这种平衡一旦遭到破坏,宿主就会因肠道菌群紊乱而发生各种疾病,因此保持肠道菌群结构的稳定是防止动物细菌性疾病发生的重要因素<sup>[11-12]</sup>。对于鱼类而言,饵料、养殖水环境等其赖以生存的条件与鱼类肠道菌群结构的形成密切相关<sup>[13-15]</sup>,所以对养殖环境与养殖鱼肠道菌群结构相关性的研究具有重要意义。目前关于不同养殖模式、不同疾病的发生等因素对常见养殖生物的肠道菌群结构影响已有诸多报道<sup>[16-18]</sup>,而对于斑石鲷肠道菌群和不同健康程度及抗生素干预下养殖鱼肠道菌群结构的变化研究未见报道。本研究中,在氟苯尼考投喂结束后,以健康、亚健康、患病以及氟苯尼考口服治疗后的斑石鲷肠道为研究对象,进行不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群结构的变化以及与养殖环境的相关性研究,以期从微生态角度分析疾病和药物对斑石鲷肠道菌群结构的影响,且为斑石鲷的健康养殖与疾病防控提供科学依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

样品于2016年4月取自山东某斑石鲷养殖场

的2个日常管理相同的养殖车间,分别为A车间和B车间,每个车间共有48个斑石鲷水泥养殖池,每个养殖池水体约40 m<sup>3</sup>,每池放养2500尾斑石鲷,体质量80~200 g/尾。每日早晚各投喂颗粒饵料1次,投喂量为鱼体质量的3%左右。循环水养殖,日换水量为100%,全年车间养殖温度保持在18~21℃,盐度为30~33,溶解氧为6.5~7.0 mg/L,氨氮为0.02~0.03 mg/L。取样时斑石鲷正处于黑身病发生期,日死亡率30~50尾/池。其中,A车间大部分养殖池患有黑身病,用于病鱼和亚健康材料用鱼的选取;2016年3月份,选取A车间3个患病养殖池,将池中少量沉底濒死鱼清除后,随机选取10尾鱼对黑身病鱼进行健康状况评估,经解剖发现这些鱼腹腔内有少量积水,肠内食物较少,肠壁充血发红,肝脏充血,属于亚健康鱼。采用饲料粘合剂将氟苯尼考拌入颗粒饵料对患黑身病斑石鲷进行口服投喂治疗,一共投喂3个疗程(5 d/疗程),每个疗程间隔7 d。B车间所有养殖池的斑石鲷均未患病,作为健康用鱼的选取。

患病鱼口服3个疗程结束后,从A车间患病养殖池挑取10尾体色明显发黑、游动异常、濒死的斑石鲷作为患病样本,并从该车间轻度发病的养殖池随机取10尾游泳离群、体色略黑、活力较弱的斑石鲷作为亚健康斑石鲷样本。随机捞取10尾该车间患病养殖池使用氟苯尼考治疗后的斑石鲷作为氟苯尼考干预下的斑石鲷样本,同时从B车间随机捞取同一养殖批次10尾活力强、体色鲜亮、游动迅速敏捷的健康斑石鲷作为健康样本。将样本鱼分别充氧打包、加冰降温运回实验室。同时用无菌采水瓶收集养殖池进水口水样2 L,用无菌采样袋收集适量颗粒饵料,与样品鱼一同带回实验室进行分析。

### 1.2 细菌总DNA提取

将鱼置于解剖盘中用70%的酒精棉球擦拭鱼体进行消毒,无菌条件下剪取样本鱼中肠部位组织,挤出肠道内容物后将肠道置于灭菌的离心管中并做好标记。将2 L水样用0.22 μm孔径的无菌纤维素滤膜抽滤,剪碎滤膜,置于无菌离心管中并标记。称取0.5 g颗粒饵料于无菌离心管中,加入少量的无菌水,用无菌剪刀剪碎后标记。上述所有样品用OMEGA公司的Soil DNA Kit试剂盒提取组织样本中的细菌总DNA。

样品DNA提取后进行分类保存,患黑身病鱼肠道样品DNA标记为D,亚健康鱼样品DNA标记为S,健康鱼样品DNA标记为H,氟苯尼考干预下的鱼样品DNA标记为T,水样DNA标记为W,颗粒饵料DNA标记为F。

### 1.3 高通量测序分析

将上述方法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'-AT-TACCGCGGCTGCTGG-3'和3'-CCTACGGGAG-GCAGCAG-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<sup>[16]</sup>。PCR的反应体系为含15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>的10×Buffer 10.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 10 μmol/L引物各5 μL, 5 U/μL Taq酶1.0 μL, DNA模板4.0 μL, 灭菌去离子水73 μL, 总体积100 μL。PCR反应条件:94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸50 s, 连续30个循环;最后72 °C延伸10 min。扩增好的DNA序列,经琼脂糖电泳检测阳性后交由广州基迪奥生物科技有限公司,用Illumina HiSeq PE250高通量测序技术序列测定和分析。

### 1.4 数据分析

用Mothur软件结合Excel进行数据统计和分析。以97%相似性为标准划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)作为分类和计算的依据。基于OTU结果计算样品的alpha多样性。Alpha多样性是对单个样品中物种多样性的分析,包括香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Simpson index)、物种丰富度指数(the abundance-based coverage, ACE)等<sup>[19]</sup>。香农指数是用来描述种的个体出现的紊乱和不确定性。辛普森指数是随机取样的两个个体属于不同种的概率,常和香农指数一起使用来反应群落中物种的多样性,物种丰富度指数是根据所测得的OTU数量预测样品中微生物的种类。同时对样本中的全部OTU进行Rank-abundance曲线分析;通过Excel分析并绘制门类水平和属水平的相对丰度图表;使用R语言绘制热图和主成分分析图;最后结合Mothur和Excel绘制Venn图<sup>[17-18]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 基于16s rDNA测序的细菌多样性分析

对各样品中高通量测序的数据进行统计,

黑身病鱼肠道(D)、亚健康鱼肠道(S)、健康鱼肠道(H)、氟苯尼考干预下鱼肠道(T)、水样(W)及颗粒饵料(F)中分别获得734、1114、1033、1112、4224和1406个OTU(表1)。通过样品测序序列计算各样品中细菌多样性指数,其中水样的香农指数最大为4.89,辛普森指数最小为0.08,即水样中的细菌多样性最高。黑身病鱼肠道的香农指数最低为2.01,辛普森指数最高为0.36,表明黑身病鱼肠道中的细菌多样性最低。综合分析发现,肠道样品细菌多样性顺序为亚健康鱼肠道>健康鱼肠道>氟苯尼考干预下鱼肠道>黑身病鱼肠道。

表1 基于16s rDNA基因序列的细菌多样性指数

Tab. 1 Bacterial diversity index based on 16s rDNA gene sequences

样品 sample	有效序列 sequences	总OTU数 total OTUs	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	物种丰富 度指数 ACE
D	79 983	734	2.01	0.36	4288
S	85 842	1114	3.25	0.11	5185
H	86 220	1033	3.05	0.15	4241
T	87 517	1112	2.48	0.23	4455
W	82 658	4224	4.89	0.08	8026
F	90 708	1406	2.45	0.32	3512

以各样品中分布的OTU数量及其相对比例为计算依据,构建了OTU的丰度等级分布曲线(图1),该曲线在水平方向上的跨度可以反映样品中细菌多样性的丰富程度,曲线在垂直方向的平滑程度可以反映样品中细菌分布的均匀程

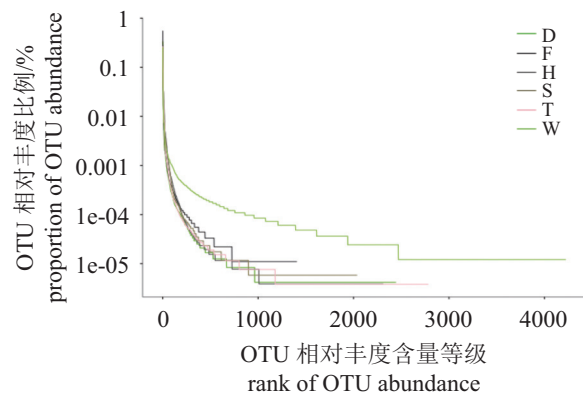


图1 各样品中细菌多样性的等级分布曲线

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

度。结果显示,水样(W)中的细菌多样性显著高于斑石鲷肠道和颗粒饵料中的细菌多样性。同时各个样品的曲线在垂直方向都比较陡峭,证实这些样品的菌群结构中都存在明显的优势细菌种类。而且4种肠道样品的曲线在垂直方向的陡峭程度比较接近,说明不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道优势菌的相对丰度差异不大。

## 2.2 菌群结构组成及相对丰度

对样品的全部有效序列进行归类操作分析,统计不同OTU所对应的细菌门类及相对丰度(表2)。结果显示,不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群结构相似,均以变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和软壁菌门(Tenericutes)为主,且相对丰度总量均达到85%以上,其中黑身病鱼肠道(D)中变形菌门优势度最高,对应的OTU数量占该样品全部OTU的70.77%。亚健康鱼(S)和健康鱼肠道(H)中厚壁菌门优势度最高,相对丰度分别达55.11%和58.09%。氟苯尼考干预下鱼肠道(T)中软壁菌门的优势度最高,相对丰度为44.54%。水样(W)中的变形菌门和厚壁菌门优势度较高,相对丰度总和达81.87%,拟杆菌门(Bacteroidetes)也占有一定的优势度。颗粒饵料(F)中变形菌门和厚壁菌门含量相对较低,蓝藻菌门(Cyanobacteria)具有较高的优势度,对应的OTU数量占该样品全部

表2 各样品优势细菌门类及相对丰度

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

门类	phyla	D	S	H	T	W	F
变形菌门	Proteobacteria	70.77	27.43	17.55	18.22	70.13	13.48
厚壁菌门	Firmicutes	20.96	55.11	58.09	23.88	11.74	26.63
软壁菌门	Tenericutes	6.54	11.71	18.22	44.54	0.09	0.02
拟杆菌门	Bacteroidetes	0.64	0.54	0.73	0.09	7.81	0.29
放线菌门	Actinobacteria	0.11	3.69	4.47	1.75	2.36	1.11
蓝藻菌门	Cyanobacteria	0.02	0.01	0.45	0.04	0.48	57.93
梭杆菌门	Fusobacteria	0.01	0.01	0.04	10.95	0.07	0.04
其他	others	0.96	1.51	0.45	0.51	7.33	0.51

OTU的57.93%。

筛选出每个样品中相对丰度最高的前20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,黑身病鱼肠道(D)中主要优势细菌是弧菌属(*Vibrio*),对应的OTU数量占该样品全部OTU数量的60.33%,其次是乳球菌属(*Lactococcus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。亚健康鱼(S)和健康鱼肠道(H)中的优势细菌均为弧菌属、乳球菌属和芽孢杆菌属,3种菌属所占比例总和分别为63.69%和54.35%,支原体(*Mycoplasma*)在2种样品中也具有一定的优势度。氟苯尼考干预下鱼肠道(T)中弧菌属的优势度较低,仅为1.29%,乳球菌属和鲸

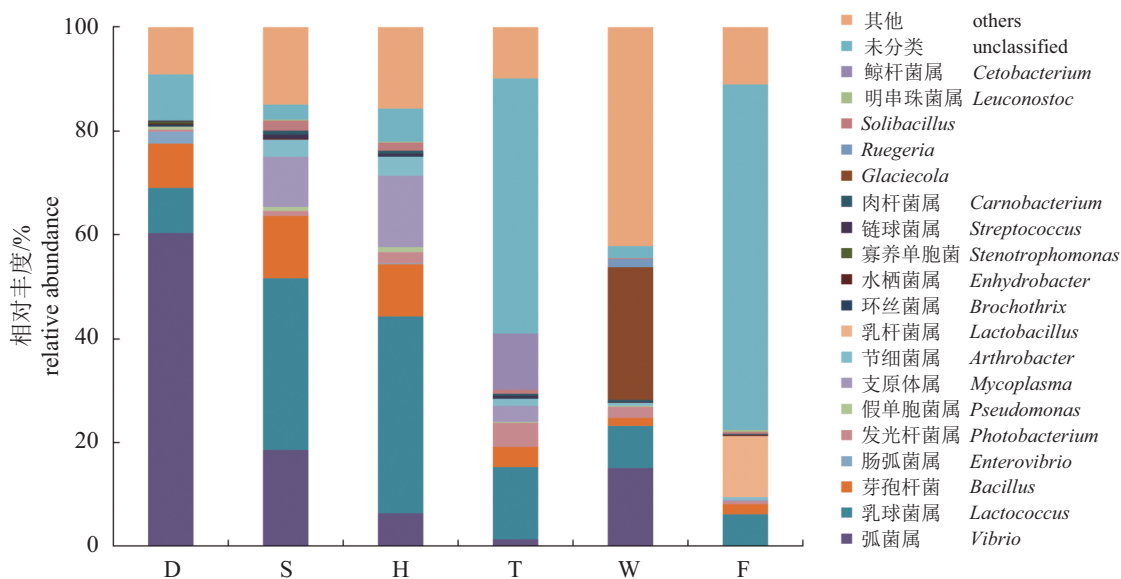


图2 各样品中属水平细菌种群结构及分布

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

杆菌属(*Cetobacterium*)为其主要的优势菌属,所占比例分别为13.88%和10.7%。水样(W)中弧菌属(15.09%)和乳球菌属(8.03%)同样是优势菌属,而交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)的*Glaciecola*属是水样的主要优势菌属,其优势度为25.52%。颗粒饵料(F)中有大量未鉴定到属的细菌,其他主要是乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和乳球菌属,所占比例分别为11.90%和6.13%。

### 2.3 各样品中细菌多样性及相关性分析

为了进一步探究不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群结构的差异及其与相关环境因子的关系,筛选出每个样品中相对丰度最高的前20种OTU,构建了含系统发育树、样品聚类关系树的热图(图3)。热图的不同颜色代表不同的相对丰度,图顶端为样品间聚类关系树。结果显示亚健康鱼肠道(S)和健康鱼肠道(H)相邻聚为一支,紧邻着是氟苯尼考干预下鱼肠道(T)和黑身病鱼肠道(D),水样(W)和颗粒饵

料(F)距离较远。同时通过绘制主成分分析图(图4)分析样品间的关系,结果显示PC1轴对样品的贡献率为50.5%,PC2轴对样品的贡献率为20.1%,4种肠道样品和水样的距离较近,颗粒饵料与其他样品相距较远。

进一步分析各个样品中菌群多样性的相互关系,选取每个平行样本OTU的并集,并构建Venn图(图5)。结果显示,不同健康程度及氟苯尼考干预下鱼肠道中共有的OTU数量为264,分别占这4种肠道样品全部OTU的10.8%、12.96%、11.26%和9.48%。其中黑身病鱼与亚健康鱼、健康鱼和药物干预鱼的肠道中共有的OTU数量相对较低,而亚健康鱼和健康鱼肠道中共有的OTU数量较高,分别占亚健康鱼和健康鱼肠道全部OTU数量的42.76%和37.16%(图5-a)。水样中的菌群多样性较高,其中有86.27%的OTU没有出现在其他样品中,与黑身病鱼、亚健康鱼、健康鱼及氟苯尼考干预下鱼肠道中共有的OTU数量分别占这

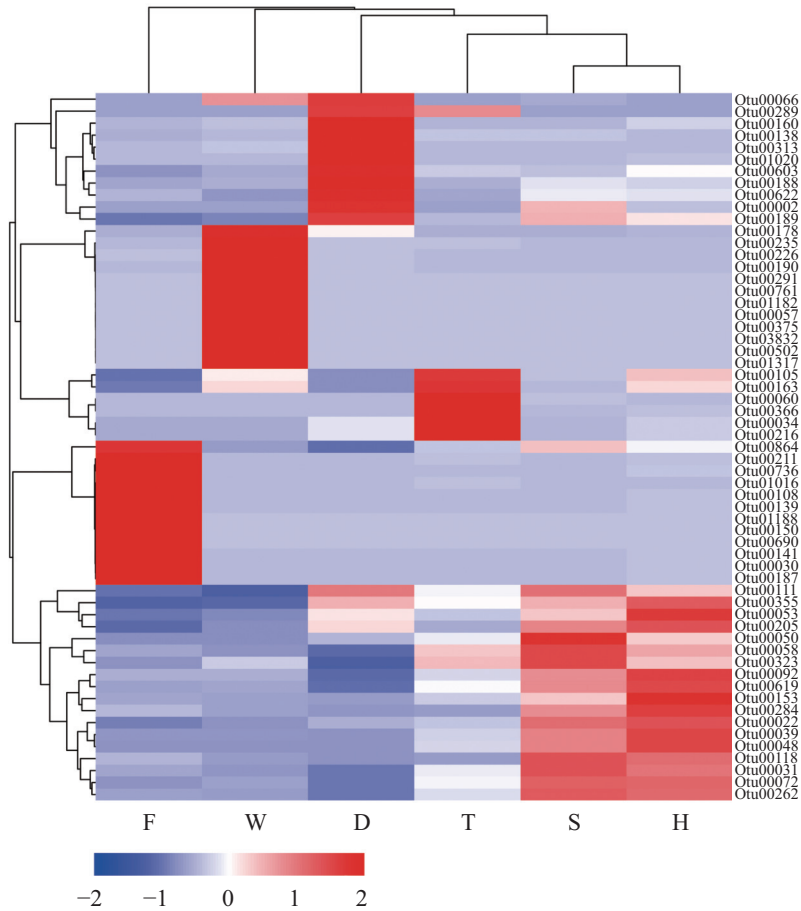


图3 各样品中丰度最高的前20种OTU分布的热图分析

Fig. 3 Heatmap analysis of the top 20 OTU at abundance of the samples

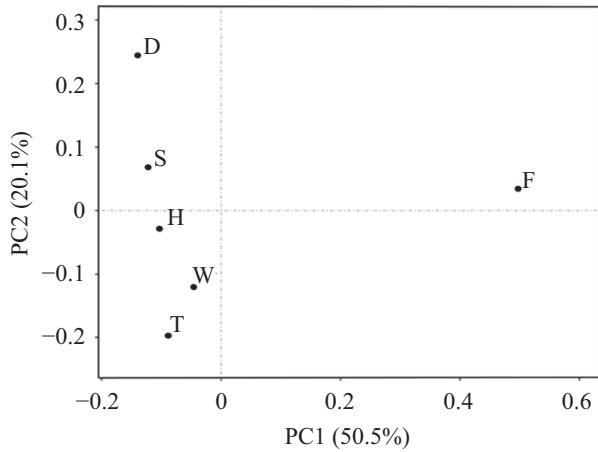


图4 不同样品主成分分析图

D. 黑身病鱼肠道; S. 亚健康鱼肠道; H. 健康鱼肠道; T. 氟苯尼考干预下鱼肠道; W. 水样; F. 颗粒饵料。下同

Fig. 4 Sorting analysis of different samples

D. intestine of diseased fish with dark body; S. sub-health fish intestine; H. healthy fish intestine; T. intestine of fish under drug intervention; W. tank inlet water; F. pellet feed. the same below

4种肠道样品中全部OTU数量的12.93%、14.83%、14.42%和11.53%(图5-b)。而颗粒饵料中,有68.5%的OTU是其特有的,与黑身病鱼、亚健康鱼、健康鱼及氟苯尼考干预下鱼肠道中共有的OTU数量分别占这4种肠道样品中全部OTU数量的8.34%、13.75%、13.91%和11.1%(图5-c)。

### 3 讨论

第二代高通量测序技术主要是通过16s rDNA分析环境中的细菌群落组成,因其具有较高的数据通量、测序深度和准确率而被广泛应用于环境及人和动物肠道菌群的研究。在近几年应用高通量测序对宿主肠道菌群的研究中发现,宿主的遗传结构、营养组分、外界环境、疾病发生等因素均能影响宿主肠道菌群的构成和功能<sup>[20-23]</sup>。在近期对人和动物的肠道菌群研究中发现,疾病的发生会导致肠道菌群结构发生

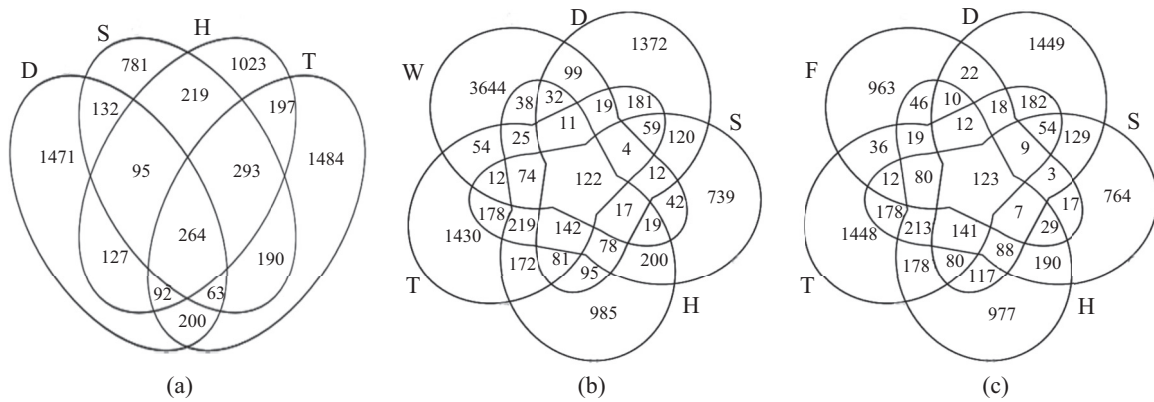


图5 各样品中细菌多样性的相关性分析

Fig. 5 The similarity analysis of bacteria diversity among different samples

明显的改变<sup>[24-25]</sup>。陈孝煊等<sup>[26]</sup>指出水体中微生物的种类、水体温度和盐度、鱼类摄食的饵料和药物及所处的生理状态和发育阶段都会影响消化道菌群的构成。张正等<sup>[17]</sup>研究发现患腹水病的半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)肠道优势菌群结构发生了明显改变。本研究发现,不同健康程度下斑石鲷肠道菌群种类组成类似,但相对丰度比例具有一定的差异。在相对丰度前20的OTU中,患黑身病斑石鲷肠道中弧菌属所对应的OTU占该样品中全部OTU的60.33%,亚健康鱼肠道中弧菌属相对丰度次之,为18.49%,健康鱼肠道中弧菌属的相对丰度为6.41%,而氟苯尼考干

干预下鱼肠道中弧菌属仅为1.29%。同时研究结果显示,弧菌属、乳球菌属和芽孢杆菌属是患病、亚健康和健康斑石鲷肠道共同的优势细菌,说明黑身病的发生虽影响了斑石鲷肠道中优势度较高的细菌种类的相对丰度,但并未显著改变斑石鲷肠道优势细菌的种类。相比于健康鱼,亚健康鱼肠道菌群结构变化较小,其中弧菌属的相对丰度从健康鱼到患病鱼是显著增加的,而芽孢杆菌属和乳球菌属的相对丰度则降低。同时热图和PCA图也显示健康鱼与亚健康鱼肠道菌群结构相似度高于其与患病鱼肠道菌群结构的相似度。

氟苯尼考等抗生素作为抗菌药物目前已广泛应用于水生动物疾病的预防和治疗中,但抗生素在使用过程中会直接或间接影响水生动物的肠道菌群结构。Dethlefsen等<sup>[27]</sup>研究发现患者使用环丙沙星后其肠道菌群中有近三分之一会受到影响。贺永亮<sup>[28]</sup>研究指出,口服高剂量的恩诺沙星水溶液35 d的小鼠在自然恢复21 d后其肠道菌群多样性与未给药时产生显著差异。本研究在饵料中添加氟苯尼考的投喂能大大减少患病斑石鲷肠道弧菌属的相对丰度,也明显改变了斑石鲷肠道菌群结构,使肠道中产生了大量其他未鉴定到属的细菌,这可能是由于氟苯尼考在有效抑制弧菌生长的同时也给一些其他细菌的生长提供了条件。因此,在养殖过程中正确使用抗生素是十分重要的,一则,不能盲目和滥用抗生素,防止肠道菌群结构紊乱,破坏肠道菌群结构平衡;二则,可筛选使用敏感药物,针对有害菌合理使用抗生素,降低其有害菌丰度,保障鱼体肠道健康。

由于鱼类生活在复杂的水环境中,因此鱼类肠道菌群结构更容易受到养殖水环境的影响<sup>[29]</sup>。Mandal等<sup>[30]</sup>研究得出鱼类体内大量的微生物摄取于生长水域环境中的水体、底泥和食物。李存玉等<sup>[18]</sup>研究表明在池塘和工厂化养殖下水环境对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肠道菌群具有一定的影响。本研究中,斑石鲷肠道的菌群与水体中的菌群相似性较高,说明斑石鲷肠道菌群会受到养殖水体的影响,与上述学者的研究一致。而张正等<sup>[31]</sup>在对池塘养殖半滑舌鳎的肠道菌群的研究中发现,半滑舌鳎肠道细菌种类的多样性和菌群结构都和池水中的细菌存在着明显的不同。同时Alexopoulos等<sup>[32]</sup>在对不同鱼类养殖场水体和养殖鱼肠道的菌群相关性的研究中发现,水中的菌群和所养殖鱼类的肠道菌群并不相关。这种差异可能是由养殖鱼种类、养殖方法、取样时间以及研究方法等方面的不同而引起的。饵料同样是影响鱼类肠道菌群结构的重要因素<sup>[33-35]</sup>。钟蕾等<sup>[36]</sup>研究发现投喂不同饵料的鳃(*Elopichthys bambusa*)肠道菌群结构存在一定的差异。郁二蒙等<sup>[37]</sup>研究得出投喂冰鲜杂鱼的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肠道菌群多样性高于投喂人工配合饲料的大口黑鲈。在本研究中,

斑石鲷肠道中的优势菌种乳球菌属和芽孢杆菌属同样是颗粒饵料中的优势菌属,说明斑石鲷肠道菌群也会受到颗粒饵料的影响,但这种影响具有一定限度,且低于水体对其影响的程度。

本研究在斑石鲷肠道中检测到乳球菌属和芽孢杆菌属等优势度较高的菌属。乳球菌属中的乳酸乳球菌(*Lactococcus Lactis*)能合成具有抗菌作用的细菌素<sup>[38-39]</sup>。芽孢杆菌能产生大量的蛋白酶、淀粉酶等胞外酶,有助于食物的消化吸收,增强机体免疫力<sup>[40-41]</sup>。同时,本研究从健康斑石鲷肠道中检测到若干细菌属的潜在致病菌,包括弧菌属、假单胞菌属、发光杆菌属、支原体等微生物种类。支原体是目前发现的最小最简单的原核生物,能够感染人和其他哺乳动物引起肺炎等疾病<sup>[42]</sup>,目前关于支原体在水产动物中报道较少,其致病性还需进一步研究。鱼类的细菌性疾病病原一般属于条件致病菌,一旦养殖环境突变,肠道细菌平衡遭到破坏,就会引发细菌性疾病,因此在养殖生产中必须重视环境条件诱发致病菌感染的发生。

## 4 结论

本研究通过16s rDNA高通量测序的方法,首次分析报道了患黑身病和氟苯尼考干预下的斑石鲷肠道菌群结构的变化、健康斑石鲷肠道菌群的优势类别及养殖环境对其的影响程度。研究表明:①不同健康程度及氟苯尼考干预下斑石鲷肠道中细菌均以变形菌门、厚壁菌门和软壁菌门为主。黑身病的发生可影响斑石鲷肠道中前20种优势细菌种类的排名次序。②在属水平上,健康斑石鲷肠道的优势菌种主要有弧菌属、乳球菌属和芽孢杆菌属。患黑身病的斑石鲷肠道中弧菌的数量显著增加,且随着弧菌属数量的增加,斑石鲷的黑身病症状也逐渐加重。③颗粒饵料中添加抗生素氟苯尼考后斑石鲷肠道弧菌数量显著降低,菌群结构也随之发生明显改变,实验证实氟苯尼考可有效减轻黑身病的症状和死亡率。④养殖水体与颗粒饵料均能影响斑石鲷肠道菌群结构,且水体对其影响大于颗粒饵料。本研究为今后斑石鲷的健康养殖、疾病防控及其微生物学研究提供了参考依据,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。

## 参考文献:

- [1] 王雨福,肖志忠,刘清华,等.斑石鲷早期发育的异速生长模式[J].海洋科学,2016,40(5):43-48.  
Wang Y F, Xiao Z Z, Liu Q H, et al. Allometric growth pattern during early ontogeny of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. Marine Sciences, 2016, 40(5): 43-48(in Chinese).
- [2] 尤宏争,李文雯,夏苏东,等.斑石鲷含肉率与肌肉营养成分分析[J].大连海洋大学学报,2016,31(2):174-179.  
You H Z, Li W W, Xia S D, et al. Dressing rate and nutrient components in muscle of spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(2): 174-179(in Chinese).
- [3] 白晓慧,尤宏争,张伟,等.斑石鲷形态性状对体质量影响的途径分析[J].经济动物学报,2015,19(4):191-194.  
Bai X H, You H Z, Zhang W, et al. Path analysis of effects of morphometric traits on body weight of *Oplegnathus punctatus*[J]. Journal of Economic Animal, 2015, 19(4): 191-194(in Chinese).
- [4] Shimada Y, Nokubi K, Yamamoto S, et al. Reproduction between *Oplegnathus fasciatus* and *O. punctatus*, and fertility of their interspecies[J]. Fisheries Science, 2009, 75(2): 521-523.
- [5] 范超,史成银.硫酸铜对斑石鲷幼鱼的急性毒性及对眼点淀粉卵鞭虫的杀灭效果[J].中国动物检疫,2016,33(11):98-102.  
Fan C, Shi C Y. Acute toxicity towards juvenile spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) and eradication effect on *Amyloodinium ocellatum* of copper sulfate[J]. China Animal Health Inspection, 2016, 33(11): 98-102(in Chinese).
- [6] 徐力文,廖昌容,刘广锋.氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J].中国水产科学,2005,12(4):512-518.  
Xu L W, Liao C R, Liu G F. Security about Florfenicol used in aquaculture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(4): 512-518(in Chinese).
- [7] 李梦影,徐丽娟,吕利群.氟苯尼考在鲫和草鱼体内的药代/药效动力学联合参数及其临床给药方案的研究[J].水产学报,2014,38(6):888-895.  
Li M Y, Xu L J, Lü L Q. Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters of Florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their significances in drawing medication regimen[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(6): 888-895(in Chinese).
- [8] Pérez T, Balcázar J L, Ruiz-Zarzuela I, et al. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem[J]. Mucosal Immunology, 2010, 3(4): 355-360.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5): 313-323.
- [12] Ring E, Olsen R E, Mayhew T M, et al. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish[J]. Aquaculture, 2003, 227(1-4): 395-415.
- [13] 潘艳艳,顾晓英,张德民,等.饥饿及恢复喂食对花鲈肠道菌群多样性的影响[J].水产学报,2016,40(5):776-784.  
Pan Y Y, Gu X Y, Zhang D M, et al. Effects of fasting and refeeding on *Lateolabrax japonicus* intestinal microflora diversity[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(5): 776-784.
- [14] Eddy S D, Jones S H. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery[J]. Aquaculture, 2002, 211(1-4): 9-28.
- [15] 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]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(9): 1585-1595.
- [16] 窦妍,赵晓伟,丁君,等.应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构[J].海洋与湖沼,2016,47(1):122-129.  
Dou Y, Zhao X W, Ding J, et al. Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(1): 122-129(in Chinese).
- [17] 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).
- [18] 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).
- [19] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [20] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [21] 郑艺, 张家超, 郭壮, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 157-164.
- Zheng Y, Zhang J C, Guo Z, *et al.* Research progress on high-throughput sequencing to analysis the diversity of gut microbiota and its influence factors[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(11): 157-164(in Chinese).
- [22] Li X M, Yu Y H, Feng W S, *et al.* Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 29-37.
- [23] Bailey M T, Dowd S E, Parry N M A, *et al.* Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(4): 1509-1519.
- [24] 魏晓, 刘威, 袁静, 等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1): 75-80.
- Wei X, Liu W, Yuan J, *et al.* Research progress on the relationship between human intestinal microbiota and host diseases[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(1): 75-80(in Chinese).
- [25] 魏晓, 杨展, 崔茜, 等. 肝硬化小鼠肠道菌群结构及血清炎症因子的变化[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(1): 25-28.
- Wei X, Yang Z, Cui Q, *et al.* Changes of intestinal microbial community and serum inflammatory factors in cirrhosis mice[J]. Letters in Biotechnology, 2014, 25(1): 25-28(in Chinese).
- [26] 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).
- [27] Dethlefsen L, Huse S, Sogin M L, *et al.* The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing[J]. PLoS Biology, 2008, 6(11): e280.
- [28] 贺永亮. 残留剂量恩诺沙星对SPF小鼠肠道菌群的影响研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- He Y L. Effects of residual dose Enrofloxacin on SPF Mice intestinal micro flora[D]. Chongqing: Southwest University, 2008 (in Chinese).
- [29] 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.
- [30] Mandal S C, Hasan M, Rahman M S, *et al.* Coliform bacteria in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* of shrimp-gher, pond and fish market[J]. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2009, 1(3): 160-166.
- [31] 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).
- [32] 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.

- [33] 鲁增辉, 李伟, 石萍, 等. 养殖鲈肠道优势菌群组成及来源分析[J]. 淡水渔业, 2011, 41(3): 29-33.  
Lu Z H, Li W, Shi P, *et al.* Study on composition and generation of predominant intestinal bacteria in cultured *Percypristis microlepis* [J]. Freshwater Fisheries, 2011, 41(3): 29-33(in Chinese).
- [34] Dhanasiri A K S, Brunvold L, Brinchmann M F, *et al.* Changes in the intestinal microbiota of wild atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 20-30.
- [35] 郝耀彤, 吴山功, 王桂堂, 等. 草鱼肠道微生物对食物改变适应性变化的研究[J]. 淡水渔业, 2015, 45(3): 46-51.  
Hao Y T, Wu S G, Wang G T, *et al.* Study on the adaptation changes of intestinal microbiota in *Ctenopharyngodon idellus* fed on different diets[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(3): 46-51(in Chinese).
- [36] 钟蕾, 向建国, 曾丹, 等. 饵料对鳊肠道微生物多样性的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 830-835.  
Zhong L, Xiang J G, Zeng D, *et al.* Effects of different diets on intestinal microbiota of *Elopichthys bambusa*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(4): 830-835(in Chinese).
- [37] 郁二蒙, 张振男, 夏耘, 等. 摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析[J]. 水产学报, 2015, 39(1): 118-126.  
Yu E M, Zhang Z N, Xia Y, *et al.* Effects of different diets on intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(1): 118-126(in Chinese).
- [38] 唐春梅, 陈俊亮, 任广跃. 一株乳酸乳球菌所产细菌素的生物学特性[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 248-251.  
Tang C M, Chen J L, Ren G Y. Biological characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. Food Science, 2013, 34(1): 248-251(in Chinese).
- [39] 孟军, 刘淑英, 黄丽红, 等. 动物微生态制剂猪肠源乳球菌的分离与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(3): 12-15.  
Meng J, Liu S Y, Huang L H, *et al.* Isolation and identification of the *Lactococcus* an animal micro-ecological agent (AMEA) from the intestines of pig[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(3): 12-15(in Chinese).
- [40] Bairagi A, Ghosh K S, 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(5): 436-446.
- [41] 李卓佳, 林亮, 杨莺莺, 等. 芽孢杆菌制剂对凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 肠道微生物群落的影响[J]. 南方水产, 2005, 1(3): 54-59.  
Li Z J, Lin L, Yang Y Y, *et al.* Effect of *Bacillus* commercial probiotic on intestinal microflora of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. South China Fisheries Science, 2005, 1(3): 54-59(in Chinese).
- [42] 王素果. 支原体脂质相关膜蛋白致病机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 44(4): 42-47.  
Wang S G. Pathogenic mechanisms on mycoplasma lipid-associated membrane proteins[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2016, 44(4): 42-47(in Chinese).

## Variance analysis of bacterial community in the intestine of cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol

XU Yan<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2\*</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>,  
LIAO Meijie<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, WANG Kai<sup>1,2</sup>, LI Wensheng<sup>3</sup>

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai 261418, China)

**Abstract:** In order to evaluate the changes of the bacterial communities in the intestine of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol, and to find out the relationship with environmental factors, the Illumina HiSeq PE250 high-throughput technique was used to analyze the bacterial community diversity and structure of the fish intestine for healthy, sub-healthy, typical dark body disease (DBD) infected and oral florfenicol intervened individuals, as well as the culture water and pellet feed. The results showed that bacterial diversity in the culture water was higher than that of intestine and pellet feed. The dominant bacterial communities in intestine were Proteobacteria, Firmicutes and Tenericutes, at different health levels and with florfenicol intervention, and the proportions of corresponding operational taxonomic unit (OTU) number to all the OTU in the samples were above 85%. It could affect the ranking order of the top 20 dominant bacterial species in intestine when the DBD occurred, with the relative abundance of *Vibrio* in Proteobacteria increasing significantly. In addition, the DBD symptoms aggravated gradually, with the increase of *Vibrio* abundance. Feeding with florfenicol could reduce the *Vibrio* abundance from 60.33% to 1.29% in the intestine of diseased fish, and also change its structure of bacterial community to a greater degree, which proved that florfenicol was effective in treating DBD. It was also found that the culture water and pellet feed had a certain influence on intestine bacterial community, and the effect of the culture water was higher than the pellet feed. The present results would provide a reference basis and technical support for the health culture, disease control and microecological study in spotted knifejaw.

**Key words:** *Oplegnathus punctatus*; dark body disease (DBD); florfenicol; intestine bacterial community; high-throughput technique; operational taxonomic unit (OTU)

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

**Funding projects:** National Key Technology R&D Program of China (2012BAD17B03); Special Research Funds for Independent Innovation and Scientific & Technology Achievements(2013ZHXX2A0801)