



5 种海水养殖石首鱼类肠道菌群多样性的比较

林能锋^{1,2}, 龚 晖², 许斌福², 潘 滢^{1,2}, 曾 红^{1,3*}

(1. 宁德富发水产有限公司, 大黄鱼育种国家重点实验室, 福建 宁德 352100;

2. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;

3. 福建师范大学生命科学学院, 南方海洋研究院, 福建 福州 350117)

摘要: 为探究海水养殖石首鱼类肠道菌群的结构特征及宿主遗传因素对肠道菌群的影响, 实验采用基于 Illumina HiSeq2500 测序平台的高通量测序技术, 对福建宁德三都澳养殖的 5 种石首鱼类(大黄鱼、黄姑鱼、鲩状黄姑鱼、鲩和眼斑拟石首鱼)的肠道菌群进行 16S *rDNA* V3~V4 区测序分析。各样本得到 unique tags 的数目为 20 351~43 347 个, 上述 5 种鱼类分别得到 479、626、603、518 和 556 个操作分类单元(OTUs), 分类注释结果显示, 这些 OTUs 可划归 33 门 273 属。5 种石首鱼类肠道内容物和肠道壁样品均以变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门细菌为主要优势菌群, 约占总菌量的 70%, 在大黄鱼肠道菌群中, 螺旋菌门细菌占比达 26.19%, 也是其主要优势菌群。在属分类水平上, 芽孢杆菌属、发光杆菌属、弧菌属、金黄杆菌属、鞘氨醇单胞菌属及假单胞菌属等属细菌是 5 种养殖石首鱼类的主要类别。肠道菌群多样性的分析表明, Shannon 多样性指数: 黄姑鱼>鲩状黄姑鱼>眼斑拟石首鱼>鲩>大黄鱼, 这些养殖石首鱼类的肠道内容物菌群的多样性均高于肠道壁。对上述鱼类种间的肠道菌群差异性分析显示, 大黄鱼与眼斑拟石首鱼之间肠道菌群的相似度要高于黄姑鱼、鲩状黄姑鱼和鲩, 而黄姑鱼、鲩状黄姑鱼和鲩间的相似度较高。研究表明, 5 种海水养殖石首鱼类肠道菌群中存在自身特色的核心菌群, 肠道菌群结构的差异与种类间的系统进化关系相似, 说明肠道菌群结构与宿主遗传因素密切相关。本研究可为养殖石首鱼类饲料及益生制剂的开发、病害的防控等提供科学依据, 并为宿主遗传因素对鱼类肠道菌群影响的研究提供相关实验证据。

关键词: 石首鱼; 肠道; 菌群结构; 16S *rDNA*

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

石首鱼科(Sciaenidae)属鲈形目(Perciformes), 在世界范围内约有 68 属 300 余种, 是鲈形目中属种最多的科之一, 我国沿海石首鱼类种属众多, 共有 17 属 30 种^[1]。人工养殖的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)还是我国单一种类养殖量最大的海水养殖鱼类, 2019 年养殖产量达 225 549 t^[2]。此外, 我国沿海的几种中大型石首鱼类, 如鲩(*Miich-*

thys miuy)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)、鲩状黄姑鱼(*N. miichthioides*), 以及自美洲引进养殖的眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)也是我国海水网箱养殖的重要种类。在海水鱼类网箱养殖中, 加大投喂量、追求快速生长等现象普遍存在, 造成养殖鱼类的消化系统负荷过大, 肠炎、消化不良等问题时常发生, 严重影响养殖效益。研究显示, 肠

收稿日期: 2020-12-28 修回日期: 2021-07-22

资助项目: 国家重点研发项目(2019YFD0900102); 大黄鱼育种国家重点实验室开放基金(LYC2017RS03); 福建师范大学生命科学学院“溪源江学者”扶持计划(2019); 福建省公益类科研院所专项(2019R1027-8)

第一作者: 林能锋(照片), 从事水产动物病害防控研究, E-mail: lnfeng@hotmail.com

通信作者: 曾红, 从事水产动物病原生物学研究, E-mail: zhbio@fjnu.edu.cn



道微生物对鱼类的营养吸收、代谢、免疫等生理活动产生重要影响,与养殖鱼类的健康水平和生产性状紧密相关^[3-8]。因此,研究石首鱼类肠道菌群结构并进行比较分析,将为益生菌等微生态制剂及饲料开发等生产实践提供科学依据,也可为养殖生产中更为科学和规范地防控疾病提供参考。

对石首鱼类肠道微生物群落的研究,前期主要是利用16S *rDNA* 克隆文库测序及 DGGE 等方法,如对大黄鱼^[9-10]、加利福尼亚湾石首鱼 (*Totaba macdonaldi*)^[11] 和眼斑拟石首鱼^[12] 等的肠道菌群状况进行了分析,但 DGGE 等方法检测通量较小,不能很好地反映肠道菌群丰度的情况。而高通量测序则可对大量复杂的肠道微生物群落样本进行快速检测分析,并可检测出样本中低丰度细菌及不可培养细菌的种类,精准解析样本在属、种水平上的微生物物种组成和丰度情况,亦可为研究宿主与肠道微生物群落在进化历史上产生的营养模式的适应性演化提供新途径^[13-15]。

近年来,在对石首鱼类肠道菌群的研究中也大量采用高通量测序技术。例如,对大黄鱼的肠道菌群结构进行了较多的基于高通量测序技术研究^[16-22]。此外,张琛等^[23] 利用高通量测序技术对日本黄姑鱼 (*N. japonicus*) 的肠道菌群进行研究。但对于其他石首鱼类肠道菌群的研究报道较少。且由于肠道菌群受到采样的时间、地点、投喂饵料、个体健康状况、发育阶段及研究方法的不同,研究结果间也存较大的差异。

本研究基于 Illumina 高通量测序平台,对5种养殖的石首鱼类肠道菌群的16S *rDNA* V3~V4区进行测序,分析肠道微生物群落的多样性,比较其肠道微生物群落的结构差异,以期为影响肠道菌群结构的因素和肠道菌群与石首鱼类的系统发育相关性提供更多的理论支持,同时,也为石首鱼类养殖中人工饲料的开发和益生菌的研究提供更多的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验样品

实验对象 大黄鱼 (Lc)、黄姑鱼 (Na)、鮓状黄姑鱼 (Nm)、鮓 (Mm)、眼斑拟石首鱼 (So) 及花鲈 (*Lateolabrax japonicus*, Lm) 商品成鱼均采自福建宁德三都澳大湾村养殖网箱。采样时间为2017年12月19日,养殖海区表层水温 15 °C,

海水 pH 值为 8.2, 盐度 30。投喂冰鲜杂鱼糜。鱼体健康,在采样前1个月内,养殖鱼未投喂药物。每种鱼分别采样9尾,随机分为3个平行组,每组3尾。

样品的分组 活鱼用 MS222 麻醉,鱼体表面用 70% 乙醇进行体表消毒,以无菌解剖剪剪取实验鱼的肠道,以无菌眼科镊轻轻挤出中、后肠的肠道内容物,每组3尾鱼的肠道内容物混匀成一个肠道内容物样品。无菌注射器吸取无菌生理盐水冲洗上述肠道样品的内壁,直到无肉眼可见肠道内容物洗出,将肠道剪碎混匀,3尾鱼的肠道组成一个鱼肠壁样品。

上述样品采样后均快速放入液氮中运回实验室,并保存于-80 °C 备用。

1.2 高通量测序

样品 DNA 的提取及 16S *rDNA* 的 V3~V4 区 PCR 扩增 肠道微生物样本 DNA 用 E.Z.N.A. stool DNA 试剂盒 (Omega Biotek, 美国) 提取。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。Nanodrop2.0 测定 DNA 浓度,并将 DNA 浓度稀释至 100 ng/μL。

16S *rRNA* 扩增 V3~V4 区的扩增使用引物序列,341F: CCTACGGGNGGCWGCAG; 806R: GGACTACHVGGGTATCTAAT, 引物带特异性 8 碱基 barcode 以区别不同样品。PCR 反应条件: 预解链 95 °C 2 min, 98 °C 解链 10 s, 62 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 27 个循环, 68 °C 延伸 10 min。PCR 反应体系: 5 μL 10×KOD 缓冲液, 5 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 引物 (5 μmol/L) 各 1.5 μL, 1 μL KOD DNA 聚合酶, 模板 DNA 100 ng, 反应总体积 50 μL。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

16S *rDNA* 的高通量测序 扩增后的样品委托广州基迪奥生物科技有限公司进行基于 Illumina HiSeq2500 平台 (PE250) 测序。数据分析方法: 根据引物的 Barcode 序列, 从下机数据中拆分出各样品测序数据, 利用 FLASH Version 1.2.11 及 Qiime Version 1.9.1 软件对数据进行过滤、拼接, 并利用数据库 (Gold database) 比对 (UCHIME Algorithm) 检测并去除嵌合体序列, 利用 Mothur 软件包对 tag 序列进行去冗余处理, 从中挑选出 unique tag 序列。用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) 对所有样品的全部 Effective Tags 序列聚类, 以 97% 的一致性 (identity) 将序列聚类成为可操作分类单元 (OTUs), 计算出每

个 OTU 在各样品中的 Tags 绝对丰度和相对丰度信息。样品均一化值 (cutoff=20 351), 以处理后的数据为基础进行后续多样性分析。物种的注释基于 SILVA 数据库的 RDP classifier。

2 结果

2.1 肠道菌群基因组 DNA 的提取及 V3~V4 区的 PCR 扩增

肠道菌群基因组 DNA 提取及其 V3~V4 区扩增的结果表明, 样品满足 16S rDNA Illumina HiSeq 2500 的测序要求。

2.2 基于 16S rDNA 高通量测序结果的菌群多样性分析

物种稀释曲线和 Shannon 稀释曲线显示, 测序量基本覆盖到样品中的所有物种, 测序量趋于饱和 (图 1)。从多样性指数来看, 黄姑鱼和鳊状黄姑鱼具有较高的群落多样性, 在所测定的 5 种石首鱼类中, 大黄鱼肠道菌群的物种多样性程度最低。

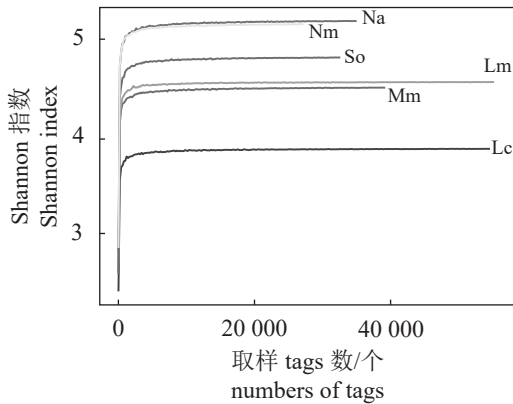


图 1 Shannon 稀释曲线

Lc. 大黄鱼, Nm. 鳊状黄姑鱼, Mm. 鳊, Na. 黄姑鱼, So. 眼斑拟石首鱼, Lm. 花鲈, 下同

Fig. 1 Shannon rarefaction curve

Lc. *L. crocea*, Nm. *N. miichthyoides*, Mm. *M. miuy*, Na. *N. albiflora*, So. *S. ocellatus*, Lm. *L. japonicus*, the same below

对测序数据进行过滤、拼接和 tags 去嵌合体处理后, 各样品肠道菌群的有效 tag 数为 55 911 和 131 039, 对有效 tag 序列进行去冗余处理后, unique tags 的数目为 20 351~43 347 个, 满足进一步数据分析的要求。样品 unique tags 的 N90 为 440~466 bp。有效 tag 的比例最高为 96.82%, 最低为 79.74%。以 97% 的一致性为标准进行 OTUs

聚类, 各样品的 OTUs 数目为 207~569 个, 平均每个样品得到 417 个 OTUs。对每个种类的肠道内容物及肠壁样品的菌群 OTU 进行合并后, 分析其共有和独有 OTU, 韦恩图如图 2 所示, 各鱼种肠道菌群共有 OTUs 数为 156 个, 特有的 OTUs 数为 118~159 个。

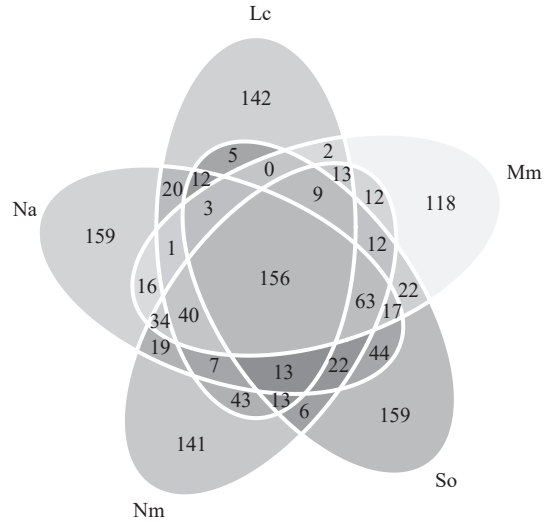


图 2 5 种养殖石首鱼类肠道菌群共有和独有 OTU 的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram detailing the number of OTUs that are unique and shared between 5 fish species

在所有样品中共鉴定出 33 个门的细菌。但有效 tags 丰度占比大于 1% 的类群只有 9 个门, 其他门类在所有 tags 中的占比通常小于 0.5%。变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 细菌在所有鱼类样品中均有检出, 其丰度占比除大黄鱼 (68.67%) 外均大于 75%, 是 5 种海水养殖石首鱼类肠道菌的主要类群。此外, 螺旋菌门 (Spirochaetae) 细菌在大黄鱼及鳊状黄姑鱼肠道菌群丰度中也有较高的占比, 尤其在养殖大黄鱼肠道菌群中, 螺旋菌门丰度占比为 26.19% (主要分布于肠壁), 远大于同海域内其他 4 种养殖石首鱼类。各鱼种肠道菌群在门一级分类阶元上的丰度占比见表 1。

在属水平上对每种鱼类肠道样品的菌群结构及分布进行统计分析, 结果显示, 相对占比前 10 的属类群中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和发光杆菌属 (*Photobacterium*) 在各种中均有出现, 弧菌属 (*Vibrio*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌群在 4 种鱼类肠道中出现。但各鱼类肠道

表 1 5 种海水养殖石首鱼类肠道菌群在门水平上的平均相对丰度

Tab. 1 Average relative abundance of intestinal flora in 5 species of mariculture Sciaenidae at phylum level

门 phylum	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	鲢状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	鲢 <i>M. miiuy</i>	眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>
变形菌门 Proteobacteria	50.07	65.40	38.60	74.13	65.60
厚壁菌门 Firmicutes	16.43	7.57	31.63	18.11	21.95
拟杆菌门 Bacteroidetes	2.17	14.51	8.51	2.70	8.58
柔膜菌门 Tenericutes	2.30	1.84	5.83	<1	<1
螺旋菌门 Spirochaetae	26.29	<1	6.37	<1	<1
放线菌门 Actinobacteria	<1	3.90	2.69	2.32	2.20
梭杆菌门 Fusobacteria	<1	<1	<1	<1	1.02
蓝细菌门 Cyanobacteria	<1	2.25	<1	1.08	<1
浮霉菌门 Planctomycetes	<1	2.37	2.51	<1	<1

样品中有各自占比较大的特征性类群，比如，在大黄鱼肠道样品中，*Lawsonia* 属和短螺旋体属 (*Brevinema*) 细菌占比分别高达 31.56% 和 26.28%，是大黄鱼肠道菌群中丰度最高的两个属。各鱼种在属水平上的肠道菌群结构如图 3 所示。

对所得 OTUs 进行种分类水平的注释，各样

品中 OTUs 在种分类水平的的注释率为 0.67%~39.58%，平均注释率为 12.14%。其中美人鱼发光杆菌 (*P. damselae*)、韩国鞘氨醇单胞菌 (*S. koreensis*)、吡啶金黄杆菌 (*C. indologenes*) 和 *Mycoplasma muris* 是相对丰度最高的 4 个种 (表 2)。

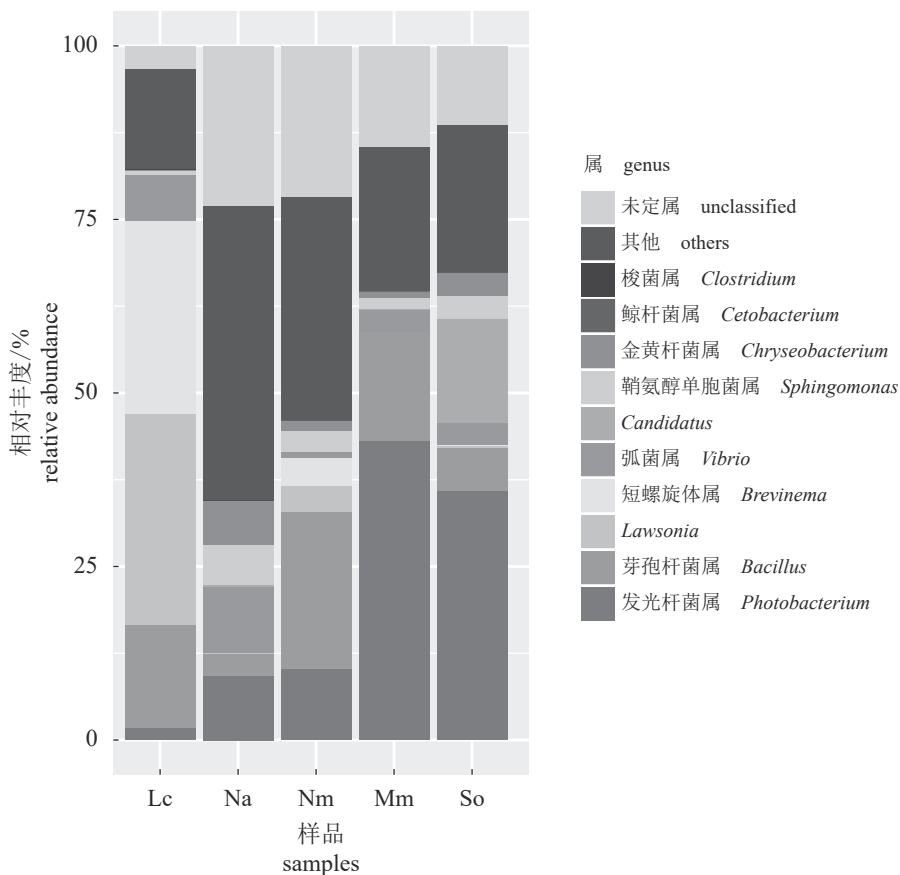


图 3 5 种石首鱼类肠道菌群属水平的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of intestinal flora at genus level of 5 species of Sciaenidae

表 2 5 种养殖石首鱼类肠道菌在种水平的相对丰度

Tab. 2 Relative abundance of 5 species of reared Sciaenidae' intestinal bacteria at species level

种 species	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	鲩状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	鲩 <i>M. miuy</i>	眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>
美人鱼发光杆菌 <i>P. damsela</i>	0.079	1.392	1.667	1.556	1.981
韩国鞘氨醇单胞菌 <i>S. koreensis</i>	0.178	4.786	1.575	1.099	2.536
吡啶金黄杆菌 <i>C. indologenes</i>	0.043	4.311	1.014	0.631	2.190
<i>M. muris</i>	2.219	1.369	0.567	0.003	0.036
其他 others	2.080	7.162	4.774	2.480	4.283
未注释 unclassified	95.402	80.981	90.404	94.231	88.974

2.3 Alpha 多样性指数的统计及多样性的差异分析

对 5 种养殖石首鱼肠道菌群的 Alpha 多样性分析结果见表 3, Chao1/ACE 指数的分析表明, 黄姑鱼及鲩状黄姑鱼肠道菌群的物种丰富度较高, 大黄鱼肠道菌群物种丰富度最低。从 Simpson/Shannon 多样性指数分析来看, 大黄鱼的肠道菌

群的丰富度和均匀度较低, 其他 4 种石首鱼的肠道菌群均匀度则较为相似。从 Goods_coverage 数据可知, 测序结果覆盖 99.6% 以上的低丰度 OTUs, 从 observed species 指标来看, 黄姑鱼肠道菌群中检测到最多的 OTUs, 大黄鱼肠道菌中能检测到的 OTU 总数最少。

表 3 基于 16S rDNA 序列的 5 种养殖石首鱼类的肠道菌群多样性指数

Tab. 3 Bacterial diversity index of 5 reared Sciaenidae based on 16S rDNA gene sequences

样品 samples	总 OTU 数/个 total OTUs	物种丰富度指数 Ace index	群落多样性指数 Shannon index	测序深度指数 observed species
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	479	497.7	3.87	351
鲩 <i>M. miuy</i>	518	613.4	4.50	443
鲩状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	603	649.3	5.16	476
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	626	724.8	5.19	535
眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>	556	577.7	4.82	419

2.4 养殖石首鱼肠道内容物与肠壁的菌群差异分析

5 种石首鱼种内的肠道内容物 (IC) 与肠壁 (IW) 菌群多样性的 weighted unifracs 分析对比结果显示, 肠道内容物的菌群丰度及多样性均高于肠壁, 其中大黄鱼 (图 4-a)、鲩 (图 4-c) 及黄姑鱼 (图 4-d) 的对比差异显著 ($P < 0.05$); 鲩状黄姑鱼 (图 4-b) 和眼斑拟石首鱼 (图 4-e) 肠壁菌群与肠道内容物菌群的多样性差异不显著 ($P > 0.05$)。

在大黄鱼中, 肠壁菌群结构与肠道内容物菌群的结构有较为明显的区别, 主要体现在肠壁菌群中螺旋菌门细菌的种类数量要显著多于肠道内容物。鲩状黄姑鱼肠道内容物中的变形菌门的数量要少于其肠壁。而黄姑鱼肠道内容物样本相比肠壁样品, 则出现了较丰富的放线菌门、蓝细菌门和浮霉菌门菌群。

2.5 养殖石首鱼类肠道菌群结构差异分析

基于 OTU 列表的物种丰度信息, 在门分类水平上进行 unweighted unifracs 主坐标分析 (PCoA) 5 种养殖石首鱼肠道菌群结构的差异性, 结果显示, 大黄鱼肠道菌群与眼斑拟石首鱼间的相似度要高于黄姑鱼、鲩状黄姑鱼和鲩, 后三者间的相似度较高 (图 5-a)。非度量多维标定法 (NMDS) (图 5-b) 表明, 5 种养殖石首鱼类之间的肠道菌群相似度要远高于它们与花鲈肠道菌群间的相似度。

以花鲈肠道菌群为外群, 对几种石首鱼类肠道菌群进行门水平上的 unweighted unifracs UPGMA 聚类分析 (图 6)。5 种养殖石首鱼类与同一养殖区的花鲈肠道菌群结构有显著差异 ($P < 0.01$)。在几种石首鱼中, 鲩与鲩状黄姑鱼有较相似的肠道菌群组成, 首先聚为一支, 然后与黄姑鱼肠道菌群和大黄鱼肠道菌群依次聚类, 眼斑拟石首鱼的肠

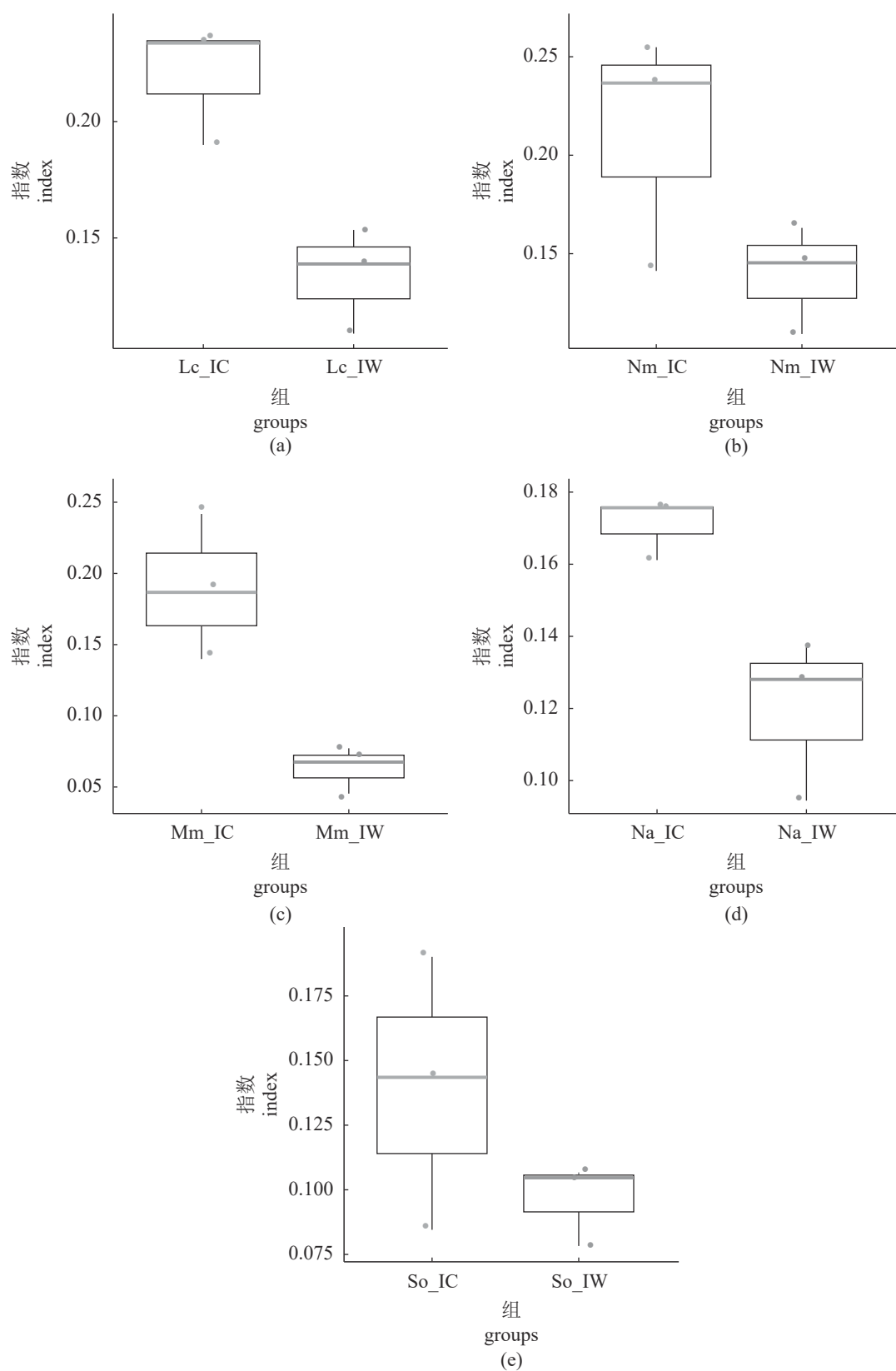


图 4 养殖石首鱼类肠道内容与肠壁菌群多样性的 weighted unifracs 分析

IC. 肠道内容物, IW. 肠壁

Fig. 4 Analysis of flora diversity from intestinal contents and intestinal wall of cultured Sciaenidae by weighted unifracs

IC. intestinal contents, IW. intestinal wall

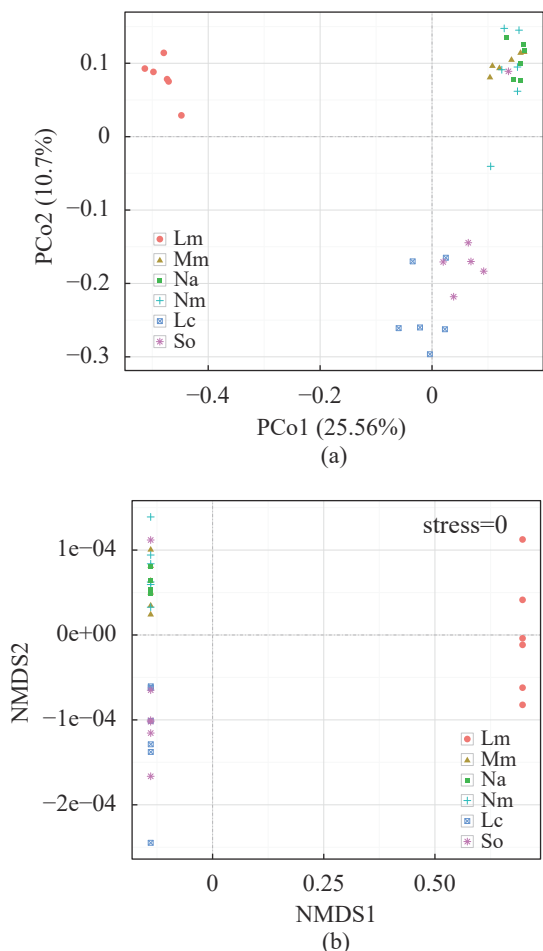


图 5 几种鱼类肠道菌群的 beta 多样性分析

(a) 主坐标分析法, (b) 非度量多维标法定法

Fig. 5 Beta diversity of intestinal microflora of 5 Sciaenidae

(a) PCoA, (b) NMDS

道菌群则最后与上述 4 种石首鱼的肠道菌群进行聚类。

对 5 种养殖石首鱼类的肠道菌群多样性进行基于 unweighted unfrac 距离的相似性分析 (ANOSIM), 结果如表 4 所示, 鲩状黄姑鱼与鲩及黄姑鱼之间肠道菌群多样性差异不显著 ($P>0.05$)。其他几组石首鱼间肠道菌群多样性差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$)。

3 讨论

迄今关于不同鱼类肠道菌群组成的研究中, 变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门细菌为最主要的优势类群, 约占肠道菌群的 90%^[14]。从本研究对 5 种海水网箱养殖的广谱肉食性石首鱼类肠道菌群 16S *rDNA* 高通量测序结果来看, 变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门细菌都为肠道和肠壁的优势菌,

各菌群在不同鱼类中的比例有较大区别, 但在石首鱼种类中, 变形菌门细菌则是最主要的优势类群。网箱养殖黄姑鱼、鲩状黄姑鱼、鲩及眼斑拟石首鱼肠道菌群中, 上述 3 个门类占比约 90%, 与上述研究一致。但大黄鱼肠道菌群中, 螺旋菌门为其肠道菌群中的第二大优势类群 (占比 26.29%), 其主要出现在大黄鱼肠壁样品中, 为短螺旋体属细菌 [该属目前只有一个命名种安德森氏短螺旋体 (*B. andersonii*), 分离自噬齿类动物^[24]]。熊向英等^[25]发现, 与健康鱼的肠道细菌组成相比, 患病卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 肠道中螺旋体门细菌的相对丰度显著增加, 厚壁菌门和拟杆菌门的细菌含量显著减少。在患肠炎病的库达海马 (*Hippocampus kuda*) 中^[26], 短螺旋体属、分枝杆菌属和弧菌属细菌显著升高。但本研究中所取的大黄鱼样品并未出现肉眼可见的病症, 摄食状况也正常, 而出现螺旋菌门中短螺旋体属细菌在肠壁上大量定殖的原因未明, 有待进一步研究。

Amato 等^[27]研究发现, 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 肠道内容物中变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门和放线菌门是主要类群, 且消化内容物的微生物类群丰度显著高于肠黏膜。本研究对 5 种石首鱼类肠道内容物和肠壁菌群结构的比较中亦发现, 肠道内容物样品的菌群多样性高于肠壁, 反映出肠壁定殖菌的种类要少于肠道内容物中的过路菌, 因此, 有必要对各物种的肠壁定殖菌及定殖机制进行深入研究, 以探讨定殖菌在鱼类代谢及健康方面的作用。

分析鱼类肠道菌群的基本组成, 对了解它们在消化和保持鱼体的正常新陈代谢中发挥的作用至关重要。对多种鱼类肠道菌群结构的研究表明, 宿主因素是影响肠道菌群结构的重要因素, 即宿主肠道菌群中存在着核心的菌群^[28-32], 这些核心菌群中含有有助于对食物进行代谢的基因, 因此可能会对鱼的消化过程产生重要影响^[3, 28, 33]。几种网箱养殖的石首鱼类摄食条件基本相同, 其肠道菌群中, 如芽孢杆菌、发光杆菌以及弧菌、假单胞菌等属的细菌在肠道菌中占比较高, 这些菌属细菌可分泌一些酶类, 参与肉食性海水鱼类消化道中重要的消化过程^[34-36]。此外金黄色杆菌、鞘氨醇单胞菌等属细菌也是多种石首鱼肠道中丰度占比较高的种类, 其在鱼类肠道中的作用尚未见报道。

定殖菌与宿主间存在共生关系, 宿主的遗传

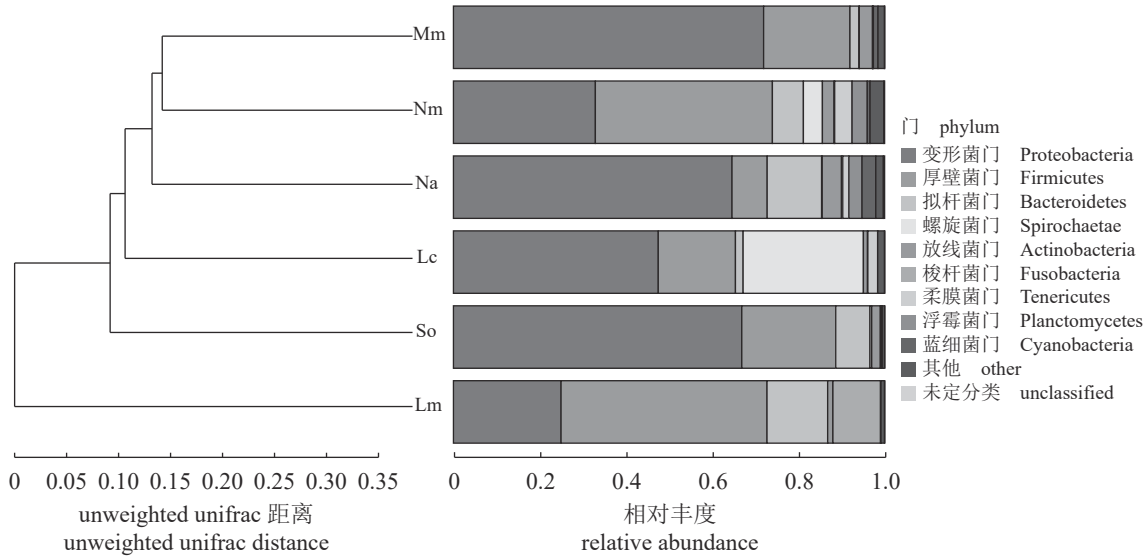


图 6 几种石首鱼类肠道菌群基于 unweighted unifrac 的 UPGMA 聚类分析

Fig. 6 UPGMA clustering analysis of intestinal flora based on unweighted unifrac

表 4 养殖石首鱼间肠道菌群基于 unweighted unifrac 距离的 Anosim 分析

Tab. 4 Anosim analysis based on the unweighted unifrac distance of intestinal flora from cultured Sciaenidae

样品 samples	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	鲩状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	鲩 <i>M. miuy</i>	眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>
大黄鱼 <i>L. crocea</i>		0.744	0.859	0.882	0.400
鲩状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	0.003**		0.035	0.080	0.535
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	0.004**	0.284		0.194	0.506
鲩 <i>M. miuy</i>	0.005**	0.211	0.043*		0.596
眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>	0.003**	0.011*	0.004**	0.003**	

注：表格斜线上方为表示差异程度的R值，斜线下方为统计分析的可信度值；* 差异显著P<0.05，** 差异极显著P<0.01
Notes: the R-value above the diagonal indicated the degree of difference, the P-value were under the diagona; *. significant difference, P<0.05, **. very significant difference, P<0.01

基础对肠道菌群组成有一定的影响^[34, 37]，因此其组成结构在一定程度上反映出物种之间亲缘关系^[38-39]。鱼的种类、样本收集的季节与地点、鱼的摄食与健康状态以及分析的方法对肠道菌群的研究结果影响很大，因此，在比较不同研究的结果和推断多样性的真实水平时，进行比较研究存在较大困难。本研究所选取的 5 种养殖石首鱼，在食性上均为广食谱肉食性鱼类，在网箱养殖中，其饵料多为冰、鲜杂鱼，本研究采集的 5 种鱼的样品来自于同一养殖区域，采样时间点相同，鱼体基本处于正常的生理状态，因此，这 5 种鱼肠道菌群结构具有较高的可比性，推测其肠道菌群结构的特点基本可以反映该鱼在采样时因种类的遗传差异而导致的肠道菌群结构差异。从本研究来看，几种养殖的石首鱼类与花鲈的肠道菌群有着显著差异，而在石首鱼科的几种鱼类中，种间

的肠道菌群系统进化关系与从形态学及分子系统进化分析所得结果基本一致。但对以肠道菌群的演化进行近缘物种间进化关系的推测还需要更多的证据。

对于鲩状黄姑鱼与日本黄姑鱼是否同种异名，学术界尚存在争论。将本研究中鲩状黄姑鱼肠道菌群的数据与张琛等^[23]的数据比较发现，二者肠道菌群的差异比较明显。本研究中鲩状黄姑鱼肠道菌群的 Shannon 多样性指数 (5.16) 明显高于日本黄姑鱼 (1.83±0.27)，鲩状黄姑鱼肠道菌群主要由变形菌门 (38.60%)、厚壁菌门 (31.60%)、拟杆菌门 (8.5%)、螺旋菌门 (6.37%) 及柔膜菌门 (5.83%) 组成，而日本黄姑鱼肠道菌群则以厚壁菌门细菌为绝对优势菌群 (91.3%)。其与本研究中其他几种石首鱼类的肠道菌群结构也有较明显的区别，初步推断，若二者在分类上是同物异名，除

了采集样品时鱼的大小、饵料种类、季节等因素之外, 养殖地环境的差异应是造成肠道菌群差异的主要原因。

养殖和野生状态下, 石首鱼类消化道的菌群结构中, 核心微生物菌群是否发生了变化, 以及影响核心菌群形成的因素等目前尚未有更深入的研究报道。有研究比较了几种淡水鱼类在养殖与自然状态下肠道微生物群组成, 发现野生鱼肠道中乳酸杆菌的种类和数量都要高于养殖的鱼类^[40], 但研究并未明确其核心菌群的变化情况。对于石首鱼类来说, 目前缺少可以用来进行比较的野生石首鱼类肠道菌群基线数据, 因此, 需要更多的野生鱼肠道菌群数据, 以更好地评估人工饲养条件下肠道菌群相应的变化情况及对鱼类生长和健康的影响。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
Meng Q W, Su J X, Miao X Z. Ichthyological systematics[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
Bureau of Fisheries of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2020 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [3] 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.
- [4] Navarrete P, Espejo R T, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 57(3): 550-561.
- [5] Wang A R, Ran C, Ringø E, *et al.* Progress in fish gastrointestinal microbiota research[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(3): 626-640.
- [6] Egerton S, Culloty S, Whooley J, *et al.* The gut microbiota of marine fish[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 873.
- [7] DePaola A, Capers G M, Alexander D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U. S. gulf coast[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 984-988.
- [8] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 143-155.
Meng X L, Li W J, Nie G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 143-155 (in Chinese).
- [9] 王程程, 鄢庆彬, 黄伟卿, 等. 福建三沙湾养殖大黄鱼肠道菌群研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(1): 1-6.
Wang C C, Yan Q P, Huang W Q, *et al.* Study on intestinal bacteria of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) in Sansha bay, Fujian Province[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2014, 19(1): 1-6 (in Chinese).
- [10] 张雯, 倪莉, 黄志清, 等. 冰鲜大黄鱼肠腔细菌类群鉴定及菌群结构分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 188-196.
Zhang W, Ni L, Huang Z Q, *et al.* Species identification and analyses on intestine bacterial flora of iced fresh large yellow croaker[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(12): 188-196 (in Chinese).
- [11] González-Félix M L, Gatlin III D M, Urquidez-Bejarano P, *et al.* Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*[J]. *Aquaculture*, 2018, 491: 239-251.
- [12] Yamamoto F Y, Yin F, Rossi Jr W, *et al.* β -1, 3 glucan derived from *Euglena gracilis* and Algamune™ enhances innate immune responses of red drum (*Sciaenops ocellatus* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 273-279.
- [13] Ley R E, Lozupone C A, Hamady M, *et al.* Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(10): 776-788.
- [14] Ghanbari M, Kneifel W, Domig K J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 464-475.

- [15] Legrand T P R A, Wynne J W, Weyrich L S, *et al.* A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 1101-1134.
- [16] 李英英, 陈曦, 宋铁英. 不同生长速度的大黄鱼肠道菌群结构的差异[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(5): 509-513.
Li Y Y, Chen X, Song T Y. Differences in intestinal flora of cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* with different growth rates[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(5): 509-513 (in Chinese).
- [17] 魏娜. 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肠道菌群结构及其与宿主经济性状间的关系 [D]. 厦门: 集美大学, 2016.
Wei N. Intestinal microbiota in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and the relationship to host economic traits[D]. Xiamen: Jimei University, 2016 (in Chinese).
- [18] 王程程. 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肠道细菌分子生态学研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2014.
Wang C C. Molecular ecology of intestinal bacteria in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2014 (in Chinese).
- [19] 景泽周. 大黄鱼肠道菌群多样性的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
Jing Z Z. Study on the diversity of bacterial community in the intestine of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Xiamen University, 2018 (in Chinese).
- [20] 柯翎, 李素一, 张丽娟, 等. 对两种不同投料方式的大黄鱼肠道菌群结构分析[J]. 畜禽业, 2019, 30(3): 4-5.
Ke L, Li S Y, Zhang L J, *et al.* Analysis of the structure of intestinal flora of large yellow croakers fed by two different methods[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2019, 30(3): 4-5 (in Chinese).
- [21] 何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 919-928.
He J J, Wang P, Feng J, *et al.* Effects of fermented soybean meal on the growth and intestinal histology and microbiota of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(5): 919-928 (in Chinese).
- [22] Zhang C, Zheng X F, Ren X, *et al.* Bacterial diversity in gut of large yellow croaker *Larimichthys crocea* and black sea bream *Sparus macrocephalus* reared in an inshore net pen[J]. *Fisheries Science*, 2019, 85(6): 1027-1036.
- [23] 张琛, 王岩, 郑侠飞, 等. 海水网箱养殖花鲈和日本黄姑鱼肠道细菌的多样性[J]. 中国水产科学, 2020, 27(9): 1113-1124.
Zhang C, Wang Y, Zheng X F, *et al.* Bacterial diversity in the gut of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and giant croaker (*Nibea japonica*) reared in seawater net pens[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(9): 1113-1124 (in Chinese).
- [24] Defosse D L, Johnson R C, Paster B J, *et al.* *Brevinema andersonii* gen. nov., sp. nov., an Infectious Spirochete Isolated from the short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*) and the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*)[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1): 78-84.
- [25] 熊向英, 王贤丰, 彭银辉, 等. 健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群结构的差异[J]. 水产学报, 2019, 43(5): 1317-1325.
Xiong X Y, Wang X F, Peng Y H, *et al.* Variance analysis of intestinal bacterial community between healthy and diseased *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1317-1325 (in Chinese).
- [26] Wang R P, Pan X, Xu Y J. Altered intestinal microbiota composition associated with enteritis in yellow seahorses *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852)[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(5): 730-737.
- [27] Amato K R, Sanders J G, Song S J, *et al.* Evolutionary trends in host physiology outweigh dietary niche in structuring primate gut microbiomes[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(3): 576-587.
- [28] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, *et al.* Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(10): 1595-1608.
- [29] Wu S G, Wang G T, Angert E R, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30440.
- [30] Han S F, Liu Y C, Zhou Z G, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S *rDNA* gene sequences[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 42(1): 47-56.
- [31] 王纯, 倪加加, 颜庆云, 等. 草鱼与团头鲂肠道菌群结构
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 构比较分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(5): 868-875.
- Wang C, Ni J J, Yan Q Y, *et al.* Comparison of the intestinal bacterial communities between grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(5): 868-875 (in Chinese).
- [32] Ni J J, Yu Y H, Zhang T L, *et al.* Comparison of intestinal bacterial communities in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, from two different habitats[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(5): 757-765.
- [33] 王红宁, 何明清, 柳苹, 等. 鲤肠道正常菌群的研究[J]. *水生生物学报*, 1994, 18(4): 354-359.
- Wang H N, He M Q, Liu P, *et al.* Study on the intestinal microflora of carp in freshwater culture ponds[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1994, 18(4): 354-359 (in Chinese).
- [34] Hoshino T, Ishizaki K, Sakamoto T, *et al.* Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25(1): 70-72.
- [35] Itoi S, Okamura T, Koyama Y, *et al.* Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(12): 1158-1163.
- [36] Ray A K, Ghosh K, Ringø E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(5): 465-492.
- [37] Weissbrod O, Rothschild D, Barkan E, *et al.* Host genetics and microbiome associations through the lens of genome wide association studies[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 44: 9-19.
- [38] 赵庆新. 鲤科四种鱼肠道菌群的相似性及其与系统进化的关系[J]. *遗传*, 2001, 23(5): 449-451.
- Zhao Q X. A Study of the construction of evolutionary tree of four fishes in Cyprinidae by similarity values of intestinal microflora[J]. *Hereditas*, 2001, 23(5): 449-451 (in Chinese).
- [39] 谭远德, 赵庆新. 利用肠道菌群的分布和DNA序列对鲤科鱼类系统演化关系的研究[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 26-32.
- Tan Y D, Zhao Q X. Study on the phylogenetic relationship of Cyprinidae based on the distributions of intestinal bacteria and DNA sequence data[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 26-32 (in Chinese).
- [40] Bucio A, Hartemink R, Schrama J W, *et al.* Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23(5): 476-482.

Bacteriological analysis of the digestive tract of five species of mariculture Sciaenidae

LIN Nengfeng^{1,2}, GONG Hui², XU Binfu², PAN Ying^{1,2}, ZENG Hong^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde Fufa Fisheries Co., Ltd., Ningde 352100, China;

2. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou 350003, China;

3. Southern Institute of Oceanography, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract: Some species of Sciaenidae were the important fishes in the artificial propagation and breeding in the world. The health of intestinal flora played a significant role in the nutrition, growth and immunity of cultured fishes. However, only a few studies on intestinal flora of cultured croakers have been reported. Investigation of intestinal flora of related species was helpful to the understanding of the influence of host genetic factors on the formation and maintenance of intestinal flora. In order to explore the interspecific structural characteristics, differences of intestinal flora of cultured croakers and the influence of host genetic factors on intestinal microflora, the 16S *rDNA* V3-V4 region of intestinal microflora was amplified from 5 kinds of yellow croaker (*Larimichthys crocea*, *Nibea albiflora*, *N. miichthyoides*, *Miichthys miiuy*, *Sciaenops ocellatus*) cultured in Sandu Bay, Ningde, Fujian Province and then were sequenced based on Illumina HiSeq2500 sequencing platform. The number of unique tags obtained from these samples were from 20351 to 43347, and the species mentioned above obtained 479, 626, 603, 518 and 556 OTUs, respectively. The classification annotation results showed that they belonged to 33 phyla and 273 genera. Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes were the dominant microflora that accounted for about 70% of the total number of the bacteria. The proportion of Spirochetes in the intestinal flora of *L. crocea* was 26.19%, and it was the dominant flora in the intestinal of *L. crocea*. *Bacillus*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, and *Pseudomonas* were the predominant genera of the reared croakers, but great differences in percentages of these genera existed among the microflora of these fish species. The analysis of the microflora diversity of cultured croakers showed that Shannon's diversity index of the intestinal flora: *N. albiflora* > *N. miichthyoides* > *S. ocellatus* > *M. miiuy* > *L. crocea*. The microflora diversity of the intestinal contents of these fishes was higher than that of the intestinal wall. According to the variation analysis of microflora between these species, *N. miichthyoides* and *M. miiuy* had the most similar intestinal microflora structure. Then they clustered with the flora of *N. albiflora*. The intestinal flora of *L. crocea* was more similar to them than that of *S. ocellatus*. At the same time, the comparative analysis of the intestinal flora structure showed that the phylogenetic factors were important in the forming of fish's intestinal microflora. In summary, the intestinal flora of the 5 species of mariculture croakers had core flora with its own characteristics. Although the fishes sampled in this study belonged to relative species and the diets habits were similar, they still had great differences in the intestinal microflora structure. The difference in intestinal flora structure was similar to the phylogenetic relationship between species, which proved that intestinal flora structure was closely related to host genetic factors. Studies on maintaining the intestinal health of aquaculture fish and providing better nutritional feed would improve economic benefits of aquaculture industry. In addition, they can also provide a huge space for the development of new fish feed supplements. This study would provide scientific basis for the development of both feed and probiotics for cultured croakers. In the meantime, the results would be helpful to the control of fish disease and providing relevant experimental evidence on proving host genetics had influence on intestinal flora.

Key words: Sciaenidae; intestine; microflora structure; 16S *rDNA*

Corresponding author: ZENG Hong. E-mail: zhbio@fjnu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2019YFD0900102); State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding (LYC2017RS03); The Scientific Research Innovation Program "Xiyuanjiang River Scholarship" of College of Life Sciences, Fujian Normal University (2019); Special Fund for Public-interest Scientific Institutions of Science and Technology Plan Projects of Fujian Province (2019R1027-8)