

# 水雍菜浮床养殖模式下黄颡鱼肠道菌群结构分析

石 焱 马徐发 吴志新 任雨薇 陈孝煊

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,武汉 430070

**摘要** 通过大规模养殖试验,研究人工浮床水培水雍菜对鱼塘养殖废水中氮磷的去除能力,并采用高通量测序方法研究养殖前后和不同处理组黄颡鱼肠道的微生物菌群结构,并分析了它们之间的相关性。结果表明:人工浮床水培水雍菜对鱼塘养殖废水中氨氮、总氮和总磷有良好的去除作用。养殖前后黄颡鱼肠道细菌多样性有明显差异;不同处理组之间的黄颡鱼肠道细菌种类多样性存在一定的差异,但优势菌群的组成并没有明显的结构差异,优势菌种的构成相似。在养殖前期黄颡鱼肠道中变形菌门(88.56%)占主要优势,末期对照组(无浮床)以厚壁菌门(48.4%)、梭杆菌门(32.52%)和变形菌门(14.56%)为主,试验组(有浮床)以变形菌门(36.72%)、厚壁菌门(21.89%)、梭杆菌门(17.48%)和拟杆菌门(11.48%)为主。

**关键词** 黄颡鱼; 肠道; 水雍菜; 人工浮床; 菌群结构; 高通量测序

**中图分类号** Q 959.4; S 917.1   **文献标识码** A   **文章编号** 1000-2421(2016)02-0069-08

水产养殖鱼类肠道中存在着大量的微生物,这些微生物对于鱼体的营养、免疫和疾病防御起着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。近些年来水雍菜浮床系统作为一种广泛应用于大水面养殖的生产模式,被证明对于养殖池塘水体中的氮、磷有较好的去除作用<sup>[4-5]</sup>,可以降低养殖过程中氨氮对于鱼体的毒性,提高鱼体免疫力和减少病害的发生<sup>[6-7]</sup>。但是目前的研究多集中于水雍菜浮床系统对于养殖水体的净化效果,关于此种养殖模式影响鱼体肠道菌群的研究较少,而鱼类肠道微生物菌群结构和数量的变化会直接影响到鱼体各项生理功能的正常发挥,微生物菌群失去平衡更会导致疾病的的发生,进而也直接影响着养殖中鱼体的成活率和养殖效益<sup>[8]</sup>。笔者拟通过对不同养殖模式下黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)肠道菌群的区别,运用高通量测序技术了解水雍菜浮床养殖模式下鱼类肠道菌群的结构及演替规律,旨在为黄颡鱼养殖疾病的科学防控奠定一定的基础,同时也为水雍菜浮床系统生态健康养殖技术提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验池塘及水体

试验选用位于湖北省黄冈市红安县中海渔业公

司的标准化养殖池塘,单个池塘面积约8 000 m<sup>2</sup>,水深1.5 m。试验时间为2014年6月20日至10月20日。试验组和对照组为不相邻的2个池塘。试验期间水温为自然水温。每个池塘中放养黄颡鱼鱼苗8万尾,鱼苗来自于湖北省武汉市新洲区某苗种场,鱼苗平均质量为(0.159±0.021) g,每天早晚投喂商业颗粒饲料,每天投喂量为鱼体总质量的0.5%左右。视天气和温度情况开启增氧机。

### 1.2 试验设计

本试验所选用的浮床栽培作物为水雍菜,采用浮网(200 cm×100 cm×5 cm)作为浮床栽培载体,浮网设2层网片,下层为密网,防止鱼类从水面上摄食水雍菜,上层为稀网,以支撑雍菜茎叶使其保持在水面上。按照30 cm×30 cm的株行距进行种植,整个浮床面积约占养殖池塘总面积的7%。

水雍菜扦插工作在池塘岸边进行,浮网每孔扦插水雍菜植株3~5株,并保证每个植株与水体接触距离为1~2 cm。试验设置一个无水雍菜浮床的对照池塘。试验组养殖池塘平面示意图如图1。

### 1.3 水体样品采集及测试

试验开始后,每隔30 d在当日上午10:00左右分别在对照池塘、试验池塘的水面下50 cm处采集

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B05);国家自然科学基金项目(31472310)

石 焱,硕士研究生。研究方向:水产微生物学。E-mail: shiyan87@foxmail.com

通信作者: 陈孝煊,教授。研究方向:水生动物病害防控。E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

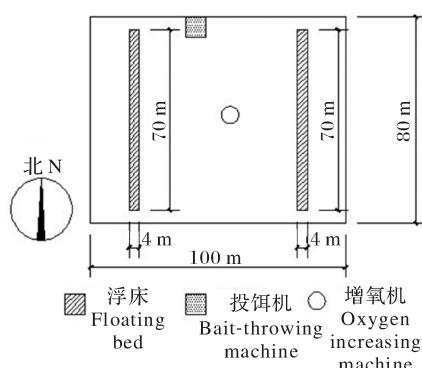


图 1 试验池塘平面示意图

Fig. 1 Planar structural sketch map of test group ponds

水样 2 L。取样地点分别在池塘中央和 4 个拐角处,将这 5 个点的水样混合后进行水质指标测定。测定方法均依据国家环境保护总局的《水和废水监测分析方法》进行。

#### 1.4 肠道样品采集及总 DNA 提取

分别在养殖开始前从黄颡鱼鱼苗(编号 ICGJ)、120 d 时从对照组池塘(编号 ICGO)、试验组池塘(编号 IEGO)中随机取 5 尾鱼进行采样,采样前整个池塘停止喂食 24 h。ICGJ 组鱼体规格为  $(0.159 \pm 0.021)$  g/尾, ICGO 组鱼体规格为  $(8.52 \pm 1.21)$  g/尾, IEGO 组鱼体规格为  $(10.98 \pm 1.47)$  g/尾。所取鱼样本于冰上静置至昏迷后用 75% 乙醇对鱼体表面消毒,打开腹腔后,用 75% 乙醇擦拭肠道外部,无菌生理盐水冲洗 2~3 次,用无菌剪刀剪开肠道,刮取肠道内容物放入无菌离心管中。将 5 尾鱼的肠道内容物混合成一个样本并做相应标记。

将 0.2 g 黄颡鱼肠道内容物放入无菌离心管中,加入 15 mL PBS 浸泡溶解。将离心管以 500 r/min 低速离心 5 min。转移上层液体于另一无菌离心管再用 15 mL PBS 重复以上步骤处理沉淀。将 2 次获得的上清液在 12 000 r/min 件下离心 10 min 收集沉淀。采用 DNA Mini Kit(德国 QIAamp 公司, Cat. No. 51306) 提取细菌基因组 DNA。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取到的基因组 DNA, 并使用 Nanodrop ND-1000 分光光度计(Thermo, 美国)进行基因组 DNA 定量。所有的样品总 DNA 均重复提取 2 次并混合在一起,以避免偏差。

#### 1.5 细菌 16S rDNA V3~V4 可变区扩增和高通量测序

选择细菌 16S rDNA V3~V4 可变区作为目的

扩增片段,进行后续高通量测序。在大部分微生物种类中,16S 第三区(V3)及第四区(V4)共长约为 459 bp。本研究中采用细菌 16S rDNA V3~V4 区通用 PCR 扩增引物 338F/806R。引物序列为:

338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3',

806R: 5'-GGAATCAGVGGTWTCTAAT-3'。

PCR 的反应体系为: 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 × Buffer 10.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 10 μmol/L 引物各 5 μL, 5 U/μL Phusion 酶 1.0 μL, DNA 模板 4.0 μL, 灭菌去离子水 73 μL。总体积为 100 μL。

PCR 条件为: 94 °C 变性 120 s; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 25 个循环; 最后于 72 °C 延伸 10 min。扩增后的 PCR 产物用磁珠法 PCR 产物标准化试剂盒(AxyPrep)纯化,随后交由欧易医学公司(上海)使用 Miseq(Illumina)高通量测序平台进行序列测定和分析。

#### 1.6 测序结果的生物信息学处理

由 Illumina Miseq 测序所得 raw reads, 取得 Miseq raw data 后对原始双端测序数据进行去杂并拼接,然后对拼接后的 paired end 数据进行精准去杂,去除低质量的碱基序列以及模糊碱基序列。随后对去杂后的数据进行去嵌合体序列处理,最终得到较优质的序列,进行下游分析。OTU(operation-taxonomic units, 操作分类单元)是在系统发生学或者群体遗传学研究中,为了便于分析,人为给某一分类单元(品系,属,种、分组等)设置的同一标志。本研究中采用 CD-HIT<sup>[9]</sup> 分类方法。将所有序列以 97% 的相似度进行 OTU 分类,序列相似度大于或等于 97% 被归为一个 OTU 单元。随后以 OTU 分类中丰度最大的序列为代表序列。

## 2 结果与分析

#### 2.1 测序结果的质量分析

通过对测序所得的序列进行预处理,去除低质量序列和模糊序列,ICGJ、ICGO、IEGO 三个样品分别得到 15 545、15 161、17 726 条细菌序列(表 1)。从细菌的有效序列长度图可以看出,细菌序列主要分布在 350~450 bp 之间(图 2)。3 个样品的细菌多样性都比较高。利用 Mothur 软件做稀释性曲线分析;从肠道中细菌的 rarefaction 曲线(图 3)可以看出,3 条曲线均趋向平坦,说明测序数据量合理,更多的数据量对发现新的 OTU 的边际贡献很小。

表1 各样品中的细菌丰度

Table 1 Bacterial richness in each samples

对象 Target	样品编号 Samples	有效序列总数 No. of reads	平均序列长度/bp Average length	有效 OTU 数量 OTUs No.	单一序列 OUT 数量 Singletons No.	覆盖度/% Coverage
16S rDNA	ICGJ	15 545	418	163	35	99.77
	ICGO	15 161	409	159	50	99.67
	IEGO	17 726	411	123	42	99.76

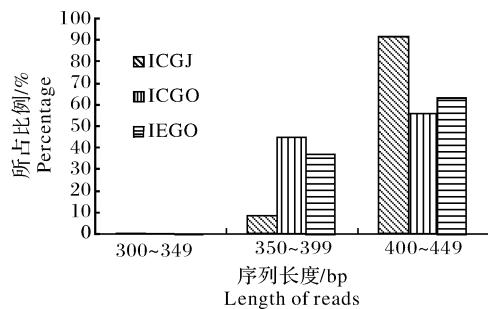


图2 样品中细菌有效序列长度

Fig. 2 Lengths of bacterial sequence in each sample

表明测序所得序列能够完全展示样品的微生物群落多样性。

## 2.2 细菌群落多样性

OTU 划分后,统计各个样品包含的 OTU 种类以及每个 OTU 中含有的序列的比例。并且对每个 OTU 挑选出代表序列,同时,将所有代表序列与 Greengenes 数据库<sup>[10]</sup>比对,通过 RDP classifier<sup>[11]</sup> Naive Bayesian 分类算法对代表序列进行分类注释。分析发现在 ICGJ 样品中,共检测到了 12 个细菌门,分别包括酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体

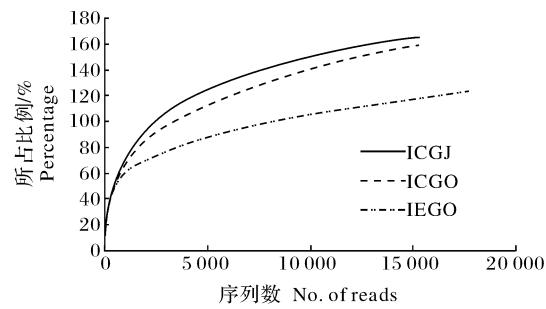


图3 各样品的稀释性曲线分析

Fig. 3 Rarefaction analysis of the different samples

(Chlamydiae)、蓝菌门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、TM7 门、[Thermi]。ICGO 中未发现放线菌门、浮霉菌门、TM7 门和[Thermi],发现了迷踪菌门(Elusimicrobia)、螺旋体门(Spirochaetes)。IEGO 中未发现衣原体、浮霉菌门,发现了螺旋体,表明 3 个样本的细菌群落的组成存在一定的差异。通过分析细菌在每个样品中的占比可以发现,拟杆菌门从养殖初期的 3.56% 变化为养殖末期对照组的 1.04% 及试验组的 11.48%,梭杆菌门

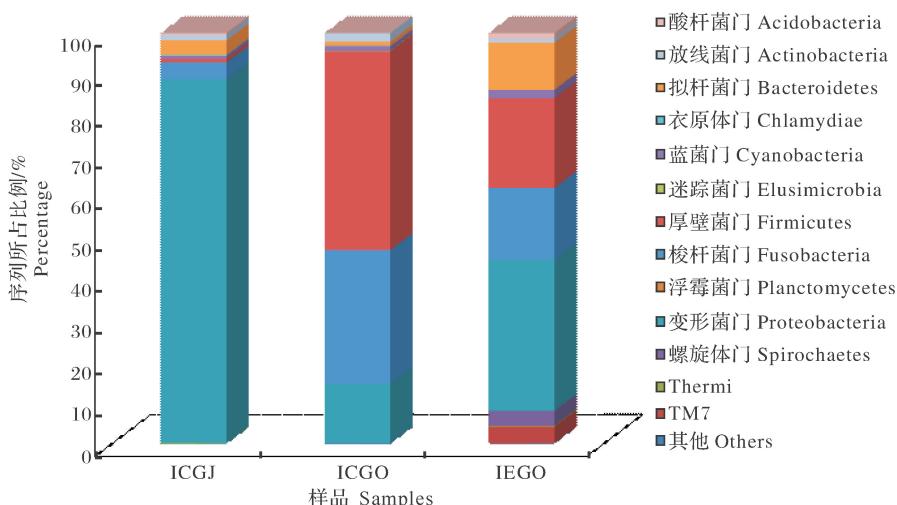
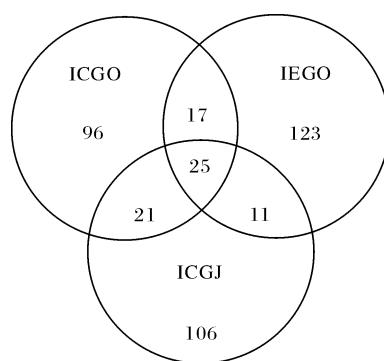


图4 各样品在门分类水平上的细菌组成

Fig. 4 Comparison of the major bacterial class in the samples

从初始的 4.07% 上升为末期的 32.52% (对照组) 及 17.48% (试验组), 厚壁菌门从 0.88% 上升为 48.4% (对照组) 及 21.89% (试验组), 变形菌门的下降非常明显, 从 88.56% 下降为 14.56% (对照组) 及 36.72% (试验组)。同时从图 3 中发现, 在养殖初期, 变形菌门在整个黄颡鱼肠道菌群中占绝对地位, 随着养殖时间的延长, 各种细菌在其肠道中的分布逐渐均匀。

使用 MOTHUR 软件中的 venn 命令及 Excel 软件以样本中的 OTU 数量为依据构建韦恩图 (图 5), 进而分析各样品中细菌的多样性。在养殖初期 (ICGJ) 的样品中有 65.03% 的 OTU 仅在该样品中被发现, 而在养殖末期, 对照组 (ICGO) 和试验组 (ICGO) 中这一数值分别为 60.38% 和 69.89%。3 个样品中共有的 OTU 数为 25, 占三者 OTU 总数的 6.27%; ICGJ 和 ICGO 样品中共有 OTU 数为 46, 占两者 OTU 总数的 18.55%; ICGJ 和 ICGO 样品中共有 OTU 数为 36, 占两者 OTU 总数的 13.58%; ICGO 和 IEGO 样品中共有 OTU 数为 42, 占两者 OTU 总数的 16.09%。表明在这 3 个样品中, 养殖黄颡鱼肠道内的细菌种类多样性差异性



图中数字为各样本中的 OTU 数量。The numbers in the diagram is the OTU in each samples.

图 5 各样品中细菌多样性的相关性分析

Fig. 5 Analysis of the bacterial diversity in the correlation between samples

比较明显。

对每个样品中细菌在不同分类水平(科和属)的分布情况进行分析, 表 2 和表 3 中列出了每个样品中 OTU 优势度最高的前 10 位科和属, 从表中可以看出黄颡鱼的肠道中存在着明显的优势菌种。结合表 2、表 3 和图 5 综合分析, 比较养殖初始和养殖末

表 2 各样品中优势度最高种的前 10 种细菌

Table 2 The bacteria of the first ten family in each sample

样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(科) Strain species (Family)	样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(科) Strain species (Family)	样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(科) Strain species (Family)
ICGJ	68.90	弧菌科 Vibrionaceae	ICGO	47.34	乳杆菌科 Lactobacillaceae	IEGO	17.48	梭杆菌科 Fusobacteriaceae
	8.23	希瓦氏菌科 Shewanellaceae		32.52	梭杆菌科 Fusobacteriaceae		12.27	乳杆菌科 Lactobacillaceae
	4.50	假交替单胞菌科 Pseudoalteromorphae		5.57	红细菌科 Rhodobacteraceae		10.93	弧菌科 Vibrionaceae
	4.05	梭杆菌科 Fusobacteriaceae		1.28	莫拉菌科 Moraxella		5.61	肠杆菌科 Enterobacteriaceae
	2.55	其他 Others		1.11	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae		4.17	紫单胞菌科 Porphyromonadaceae
	1.60	气单胞菌科 Aeromonadaceae		1.07	根瘤菌科 Rhizobiaceae		4.11	梭菌科 Clostridiaceae
	0.77	蓝藻 Cyanobacteria		1.06	蓝藻 Cyanobacteria		4.00	柔膜菌纲 Mollicutes
	0.76	诺卡氏菌科 Nocardiaceae		0.86	布鲁氏菌科 Brucellaceae		3.91	红细菌科 Rhodospirillaceae
	0.51	乳杆菌科 Lactobacillaceae		0.82	甲基杆菌科 Methylobacteriaceae		3.85	拟杆菌科 Bacteroidaceae
	0.50	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae		0.70	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae		3.65	[Borreliaceae]

表3 各样品中优势度最高属的前10种细菌

Table 3 The bacteria of the first ten genus in each sample

样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(属) Strain species (Family)	样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(属) Strain species (Family)	样品 Sample	丰度/% Percentage	相似菌种(属) Strain species (Family)
ICGJ	68.90	弧菌属 <i>Vibrio</i>	ICGO	47.34	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	IEGO	17.48	鲸杆菌属 <i>Cetobacterium</i>
	8.23	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>		32.52	鲸杆菌属 <i>Cetobacterium</i>		12.27	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>
	4.50	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>		3.96	副球菌属 <i>Paracoccus</i>		10.92	弧菌属 <i>Vibrio</i>
	4.05	鲸杆菌属 <i>Cetobacterium</i>		1.59	红细菌属 <i>Rhodobacter</i>		5.58	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>
	2.55	其他 <i>Others</i>		1.07	根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>		4.17	<i>Dysgonomonas</i>
	1.59	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>		1.06	蓝藻 <i>Cyanobacteria</i>		4.11	梭菌属 <i>Clostridium</i>
	0.77	蓝藻 <i>Chloroplast</i>		1.01	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>		4.00	柔膜菌纲 <i>Mollicutes</i>
	0.59	诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>		0.86	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>		3.91	红细菌属 <i>Rhodospirillum</i>
	0.51	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>		0.67	鞘脂杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>		3.85	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>
	0.39	赤杆菌属 <i>Erythrobacter</i>		0.67	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>		3.65	螺旋体 <i>Spironema</i>

期黄颡鱼肠道细菌的优势菌群之间的差异,以及养殖末期试验组和处理组之间黄颡鱼肠道优势菌群之间的差异,前者之间的差异要比后者之间的差异显著。

### 3 讨论

水蕹菜作为一种可以净化水体的常见蔬菜,可以将水体中的氮磷元素输出并且不会再次对水体造成污染<sup>[12]</sup>。有研究发现,在养殖水体中铺设水生植物后大部分的氮元素是通过微生物降解而达到去除的效果,仅有一小部分会累积于水生植物的各个组织中,而水生植物的根系在这个过程中提供的氧化还原反应微环境,为各种厌氧、好氧微生物生存提供了有利条件,从而加强了去除氮元素的效果<sup>[13-14]</sup>。

随着水产养殖密度的逐年增加,水产养殖中的病害也越来越严重<sup>[15]</sup>,其中水产养殖动物的细菌性疾病近年来给我国的水产养殖业造成了巨大的损失。微生态学认为,细菌性疾病在水产动物上发生的原因是由于其自身体内的菌群失衡后,导致机体的免疫力下降,病原细菌得以入侵引起水生生物感染发病<sup>[16]</sup>。在传统养殖过程中,应对细菌性疾病的方法往往是使用抗菌素,但抗菌素在使用的过程中,也对水产养殖业的发展造成了许多不利的影响,比如导致细菌耐药性的增加,对自然环境的影响等<sup>[17]</sup>。近些年通过研究发现,在生产过程中投喂益

生菌能够提升水产养殖动物自身的免疫力,并通过拮抗和竞争作用来抑制病原菌的生长<sup>[18]</sup>。因此,对于池塘养殖黄颡鱼的微生态研究有重要的现实意义,在研究过程中可能筛选出新的益生菌。目前双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、乳球菌属 *Lactococcus* 以及乳酸菌属 *Lactobacillus* 被公认为水产养殖动物上的潜在益生菌<sup>[19]</sup>。对于黄颡鱼养殖而言,之前也有众多关于其益生菌的研究,有学者从黄颡鱼肠道中分离出了芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),发现其在体外试验中对于感染黄颡鱼的病原菌有较好的拮抗作用<sup>[20-21]</sup>。但在本研究中,仅在养殖开始时在黄颡鱼的肠道中发现了芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),其优势度仅为 0.013%,且在养殖末期的对照组和试验组中均未再次检测出,表明芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)并不是黄颡鱼肠道的优势菌种,且不能在黄颡鱼的肠道中定植,这与 Wu 等<sup>[19]</sup>运用高通量技术对于草鱼肠道细菌群落的研究相同,但与之前采用传统培养技术分离黄颡鱼肠道细菌所取得的结果有较大的差异<sup>[20]</sup>。所以芽孢杆菌可能不能作为一种有效的益生菌运用于黄颡鱼的养殖。对黄颡鱼肠道的其他细菌研究表明,鲸杆菌属(*Cetobacterium*)从试验初始的 4.05% 上升为末期试验组的 17.48% 和对照组的 32.52%。有学者从 5 种不同种类淡水鱼肠道中分离出的鲸杆菌属(*Cetobacterium*),其能够发酵多肽碳水化合物,而在发酵的过

程中能够产生维生素B<sub>12</sub><sup>[22]</sup>,这表明鲸杆菌属细菌在鱼类的消化和营养过程中有重要的作用。乳杆菌属(*Lactobacillus*)发生了大幅度的上升,从初始时的0.51%上升为对照组的47.34%和试验组的12.27%。乳酸杆菌作为一种重要的益生菌,可以增强宿主免疫力,其在生长过程中会产生细菌素和乳酸,抑制某些病原细菌的生长,抵抗病原菌入侵肠道,从而对宿主产生积极影响<sup>[23-24]</sup>。所以可以推论鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)可以作为黄颡鱼养殖过程中使用益生菌的备选。假交替单胞菌(*Pseudoalteromonadaceae*)在养殖初始时期也是黄颡鱼肠道内的优势菌群之一,有研究者在哺乳动物体内发现了这类细菌并且证明其对宿主是有益的<sup>[25]</sup>,但是在养殖的末期,这类细菌已经不是黄颡鱼肠道的优势菌群,并且目前也没有假交替单胞菌作为益生菌应用于水产养殖动物的报道,且一些假交替单胞菌是潜在的病原菌,所以其能否作为一种有效的水产养殖益生菌来使用还值得进一步的研究。

对于肠道内其他细菌的研究发现,弧菌属(*Vibrio*)从养殖初期的68.9%降低到试验组养殖末期的10.92%,且已不在养殖末期对照组的优势菌群范围内。Sugita等<sup>[26]</sup>的研究发现,弧菌在淡水养殖中的鱼体肠道的稳定存在对于鱼体的健康是有益的,但是也有众多的研究表明,弧菌中的许多菌株为水产养殖动物的条件致病菌<sup>[27-28]</sup>。在养殖初期的黄颡鱼肠道中,希瓦氏菌属(*Shewanella*)是占比为8.23%的优势菌种。关于希瓦氏菌属(*Shewanella*)在鱼类肠道中的分布报道的不多,Kozińska等<sup>[29]</sup>在虹鳟肠道中分离出了此细菌,同时研究发现腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrifaciens*)是一种潜在的致病菌。对低丰度细菌的分析中,在养殖后期的对照组中我们发现了丰度为0.013%的黄杆菌(*Flavobacterium*),但在其他样品中未发现。周金敏等<sup>[21]</sup>对患细菌性出血病的黄颡鱼的肠道进行研究,发现其患病鱼前肠、中肠黄杆菌的含量高于健康鱼;Wu等<sup>[19]</sup>运用高通量测序的方法在健康的草鱼肠道中也检测出了黄杆菌,同时,也有学者在养殖环境中检测出了黄杆菌(*Flavobacterium*),由此可以表明导致水样养殖动物患严重细菌性疾病的潜在的病原体在养殖环境和鱼肠道中是广泛存在的<sup>[3,30]</sup>。

通过对比不同养殖时期黄颡鱼的肠道微生物群落后发现,在不同养殖时期黄颡鱼肠道中的微生物的相对丰度和优势菌群发生了较为明显的变化。但

是高通量测序结果发现梭杆菌门(Fusobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)是在不同养殖时期普遍存在的优势菌群,Nam等<sup>[31]</sup>对于其他脊椎动物的研究也得到了类似的结论,且在对于草鱼、黄颡鱼、珊瑚鱼等鱼类的研究结果也得出了一致的结论<sup>[19,30,32]</sup>,由此推测这4种细菌门是鱼类肠道中的核心菌群,但是他们在不同鱼类肠道中发挥的作用可能存在差异,这些差异有待进一步研究。Grisez等<sup>[33]</sup>和David等<sup>[34]</sup>对不同鱼类的研究皆表明在鱼类不同的生长时期其肠道菌群结构均存在明显差异,Wu等<sup>[19]</sup>运用罗氏454测序系统对于草鱼肠道内容物及肠道壁的研究表明,位于不同生长阶段的鱼体在消化道微生物的种类和分布上存在明显差异,这和本研究中黄颡鱼肠道细菌群落在不同生长发育阶段差异显著的结果一致。由此推测,养殖环境随着季节的变化而改变和生长时期的不同可能是导致在不同养殖时期黄颡鱼肠道微生物产生差异的主要原因。

在早期通过常规方法对于牙鲆肠道中的菌群组成研究发现,其组成会受到水体中细菌群落的影响<sup>[35]</sup>。同时也有学者指出水体的盐度、水温、微生物的种类、鱼类摄食的饵料或药物、鱼类所处的不同生理状态和发育阶段都会影响消化道菌群的构成<sup>[36]</sup>。但是随着分子生物学技术的发展,特别是第二代测序技术的普及,人们逐渐发现水体中的细菌对于鱼类肠道微生物的影响非常小。李彤彤等<sup>[37]</sup>通过同一养殖池塘的不同摄食结构的淡水鱼类肠道内容物、肠粘膜和相关的环境样品进行研究,表明不同种鱼类肠道菌群结构并不是对其所栖息环境的微生物的简单反映,而是源自肠道内部的种类特异性选择压力(取决于种特异性的免疫和代谢)。Wu等<sup>[19]</sup>通过对于草鱼的研究发现草鱼肠道内的细菌是由纤维素饲料逐渐富集在草鱼肠道内,投喂饲料中的细菌组成可显著影响鱼类肠道菌群的组成。张正<sup>[38]</sup>对池塘养殖半滑舌鳎运用传统方法和高通量测序方法结合的研究表明,池塘养殖半滑舌鳎的各个组织器官中的微生态组成十分相似,在人工养殖的半滑舌鳎中存在特定的优势菌群,养殖环境、模式亦或是鱼体健康状态的改变均不能对这些优势菌群产生影响,这些优势菌群可能在苗种的阶段就已经在半滑舌鳎的体内定植,并且其对于外来细菌在肠道内的定植有抑制作用,本研究中在不同养殖模式下养殖的黄颡鱼肠道内也存在相同的优势菌群,与其推测一致。但是李存玉等<sup>[39]</sup>认为海水鱼类牙鲆

肠道优势菌群主要与营养代谢调节相关,在池塘和工厂化2种不同养殖条件下牙鲆肠道菌群结构均受到养殖水环境中菌群的影响,且与饵料中菌群关系密切。鱼种、地域以及水环境的不同可能是引起不同研究中差异产生的原因。

本研究揭示了不同养殖环境下黄颡鱼肠道菌群的组成及分布,这对水蕹菜浮床养殖系统的研究及养殖过程中疾病的防治都具有重要参考意义。

## 参 考 文 献

- [1] 尹军霞,林德荣. 肠道菌群与疾病[J]. 生物学通报,2004,39(3):26-28.
- [2] 华雪铭,周洪琪. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J]. 水产学报,2001,25(5):448-453.
- [3] POND M J,STONE D M,ALDERMAN D J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture,2006,261(1):194-203.
- [4] 黄婧,林惠凤,朱联东,等. 浮床水培蕹菜的生物学特征及水质净化效果[J]. 环境科学与管理,2009,33(12):92-94.
- [5] 周楠楠,高芮,张择瑞. 浮床植物系统对富营养化水体的净化效果[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):337-339.
- [6] LIU C H,CHEN J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish and Shellfish Immunology,2004,16(3):321-334.
- [7] KROUPOVA H,MACHOVA J,SVOBODOVA Z. Nitrite influence on fish: a review[J]. Veterinarni Medicina,2005,50(11):461.
- [8] DIMITROGLOU A,MERRIFIELD D L,CARNEVALI O,et al. Microbial manipulations to improve fish health and production—a Mediterranean perspective [J]. Fish and Shellfish Immunology,2011,30(1):1-16.
- [9] LI W,GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. Bioinformatics,2006,22(13):1658-1659.
- [10] DESANTIS T Z,HUGENHOLTZ P,LARSEN N,et al. Green-genes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and work-bench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology,2006,72(7):5069-5072.
- [11] WANG Q,GARRITY G M,TIEDJE J M,et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology,2007,73(16):5261-5267.
- [12] 李欲如,操家顺,徐峰,等. 水蕹菜对苏州重污染水体净化功能的研究[J]. 环境污染与防治,2006,28(1):69-71.
- [13] 靖元孝,杨丹青. 风车草(*Cyperus alternifolius*)人工湿地系统氮去除及氮转化细菌研究[J]. 生态科学,2004,23(1):89-91.
- [14] 蒋跃平,葛滢,岳春雷,等. 轻度富营养化水人工湿地处理系统中植物的特性[J]. 浙江大学学报(理学版),2005,32(3):309-313.
- [15] 王玉堂. 鱼类抗菌肽的研究进展 [J]. 中国水产,2014(11):53-56.
- [16] 刘敏,韩英,马旭洲,等. 益生菌制剂在水产动物疾病防治应用的研究进展[J]. 水产学杂志,2003(16):73-79.
- [17] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture:a growing problem for human and animal health and for the environment [J]. Environment Microbiology,2006,8(7):1137-1144.
- [18] 马如龙,杨红玲,孙云章,等. 2株鱼源芽孢杆菌的生物学特性研究[J]. 水产科学,2010(9):505-509.
- [19] WU S,WANG G,ANGERT E R,et al. Composition,diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine [J]. PloS ONE,2012,7(2):e30440.
- [20] WU S, TIAN J, WANG G, et al. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2012,28(5):2165-2174.
- [21] 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究 [J]. 水生生物学报,2012,36(1):78-84.
- [22] TSUCHIYA C, SAKATA T, SUGITA H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish [J]. Letters in Applied Microbiology,2008,46(1):43-48.
- [23] PANIGRAHI A, KIRON V, KOBAYASHI T, et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2004,102(4):379-388.
- [24] PANIGRAHI A, KIRON V, PUANGKAEW J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture,2005,243(1):241-254.
- [25] RAOULT D. Probiotics and obesity: a link? [J]. Nature Reviews Microbiology,2009,7(9):616.
- [26] SUGITA H, TSUNOHARA M, FUKUMOTO M, et al. Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes [J]. Nippon Suisan Gakkaishi,1987,53(2):2287-2290.
- [27] THOMPSON P L,IIDA T,SWINGS J. Biodiversity of vibrios [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,2004,68:403-431.
- [28] SUN K,ZHANG W W,HOU J H,et al. Immunoprotective analysis of *VhhP2*, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate [J]. Vaccine,2009,27:2733-2740.
- [29] KOZINSKA A,PĘKALA A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish:a potential new pathogen of the fish [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists,2004,24(4):189.
- [30] WU S,GAO T,ZHENG Y,et al. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Aquaculture,2010,303:1-7.

- [31] NAM Y D, JUNG M J, ROH S W, et al. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing [J]. PloS ONE, 2011, 6(7):65.
- [32] SMRIGA S, SANDIN S A, AZAM F. Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces [J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 73: 31-42.
- [33] GRIEZ L, REYNIERS J, VERDONCK L, et al. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development [J]. Aquaculture, 1997, 155(1):387-399.
- [34] DAVID W, SHIELDS R J, BRICKNELL I R, et al. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries [J]. Aquaculture, 2003, 219(1):21-42.
- [35] TANASOMWANG V. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Pathology, 1988, 23: 77-83.
- [36] NAYAK S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11):1553-1573.
- [37] 李彤彤,李爱华.应用高通量测序技术比较三种不同鱼肠道微生物的群落结构 [C] //湖北省科学技术协会.2013年湖北省暨武汉微生物学会员代表大会暨学术年会论文摘要集.武汉:湖北省科学技术协会,2013:178.
- [38] 张正.养殖半滑舌鳎常见疾病的病理学观察与感染微生态分析 [D]. 青岛:中国海洋大学图书馆,2012.
- [39] 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.

## Intestinal microbial communities of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) in pond with *Ipomoea aquatica* forsk planted on artificial floating beds

SHI Yan MA Xufa WU Zhixin REN Yuwei CHEN Xiaoxuan

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University / Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture / Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

**Abstract** The removal capacity of nitrogen and phosphorus by *Ipomoea aquatica* Forsk planted on artificial floating beds were emphatically studied, and the microflora structure in the yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) intestine were analyzed by using high-through sequencing technique. The results showed that ammonia nitrogen, total nitrogen and total phosphorus can be removed by the *I. aquatica* Forsk planted on artificial floating beds, with high removal efficiency. There were some differences in the intestinal bacteria diversity between the experimental (with artificial floating beds) and control (without artificial floating beds) groups. But the bacterial composition of different groups did not significantly vary from each other, and the predominant species were similar in all groups. At the beginning period, Proteobacteria was dominant (88.56%) in the yellow catfish intestine, and at the ending period, the dominant bacterial community in the control group were Firmicutes (48.4%), Fusobacteria (32.52%) and Proteobacteria (14.56%), whereas in the experimental group, the core microbiota composed of Proteobacteria (36.72%), Firmicutes (21.89%), Fusobacteria (17.48%) and Bacteroidetes (11.48%). This study provided a more comprehensive understanding that *I. aquatica* Forsk planted on artificial floating beds can change the flora structure of the yellow catfish intestine.

**Keywords** yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*); intestine; *Ipomoea aquatica* Forsk; artificial floating beds; microflora structure; high-through sequencing technique

(责任编辑:边书京)