

DOI: 10.12264/JFSC2023-0085

基于 16S rRNA 高通量测序的长江口日本鳗鲡幼体肠道微生物群落研究

常亚娟¹, 唐文乔^{1,2}, 郭弘艺^{1,2}

1. 上海海洋大学海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用省部共建教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了解长江口日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)幼体肠道微生物的结构特点和多样性组成, 探索其潜在功能, 采用 MiSeq 16S rRNA 高通量测序技术对 2022 年 1—4 月每月 VA 期和 VB 期 2 个发育时期的肠道样本进行微生物测序, 分析了肠道微生物的 OTU 数量、菌群组成、丰度及 Alpha 多样性, 并预测其功能。8 个样本共测得 1467 个 OTU, 每个样本平均 396 个。共鉴定出 51 门、140 纲、286 目、414 科、643 属、959 种, 每个样本平均包含 26 门和 229 属, 并表现出随月份递增而门数和属数明显减少的现象。在门水平上, 以变形菌门(Proteobacteria)(81.33%)和拟杆菌门(Bacteroidota)(10.61%)为优势菌群。在属水平上, 主要由嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)(35.10%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)(16.75%)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)(7.99%)、无色杆菌属(*Achromobacter*)(4.82%)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)(4.21%)等组成, 显示了一组与其他鱼类不同的肠道微生物群落。1 月组的肠道菌群丰度及多样性显著高于其他月组($P < 0.05$), 其他 3 个月组之间及 2 个发育期组(VA 期组和 VB 期组)之间均无显著性差异($P > 0.05$)。KEGG pathway 注释预测肠道菌群编码的大多数基因与新陈代谢相关, 其中氨基酸转运与代谢功能类群的相对丰度较高。本研究解析了长江口日本鳗鲡幼体的肠道微生物结构组成及其时间变化特征, 并分析了其优势菌群可能的作用途径, 为其苗种繁育及饵料研制提供参考。

关键词: 长江口; 日本鳗鲡; 16S rRNA; 肠道微生物; 优势菌群; 功能预测

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0699-12

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是一种具有重要经济价值的降海洄游型鱼类, 产卵场位于西马利亚纳海脊附近^[1], 孵化的柳叶鳗仔鱼随北赤道洋流和黑潮暖流漂至中国、日本、韩国的等大陆架海域变态成玻璃鳗, 并在河口变态成线鳗^[2]。这种复杂的生活史特性, 使得人工育苗困难重重, 如无法完全模拟出鳗苗生长的环境, 未能找到合适的饵料等^[3], 目前养殖所用的鳗苗完全依赖于天然捕捞^[4]。近年来, 我国学者对日本鳗鲡的研究主要集中在鳗苗的资源动态^[5-6]、早期生活史特征^[7]、发育时相^[8]等方面。但对日本鳗鲡幼体的肠道微

生物的研究却鲜有报道。

肠道是鱼类消化食物和吸收营养的器官。鱼类肠道微生物中的细菌种类主要是在肠道中能够生存的来自环境或者饵料的菌群^[9], 其与宿主以及所处的水环境形成相互依赖、相互制约的微生物体系, 与鱼类的生长发育、营养吸收与代谢、免疫等诸多生理生化功能息息相关^[10-12]。鱼类孵化以后, 环境和饵料是影响肠道微生物的主要因素^[13]。Zhu 等^[14]研究了日本千叶山养殖的日本鳗鲡成体的肠道微生物, 发现鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、

收稿日期: 2023-04-09; 修订日期: 2023-04-19.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900802); 国家自然科学基金项目(31093430).

作者简介: 常亚娟(1996–), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物学. E-mail: y_j_chang@163.com

通信作者: 唐文乔, 博士, 教授, 研究方向为鱼类学与保护生物学. E-mail: wqtang@shou.edu.cn

红杆菌属(*Rhodobacterales*)在生物素代谢和脂肪酸合成代谢过程中起关键作用。刘海姿等^[15]研究发现投喂开口配合饵料相比投喂红虫的美洲鳗(*Anguilla rostrata*)白仔苗肠道中的益生菌增加。因此,分析鱼类肠道微生物的组成,有助于了解鱼类生长环境的特征及其生理特点,对野生资源的管理和养殖利用具有重要意义。随着测序技术的快速发展,基于 16S rRNA 扩增子测序的高通量测序技术逐渐成为微生物群落结构研究的主要手段^[16],其最大的优势是对微生物菌群种类和数量可以精确解析^[17],该技术已被广泛应用于肠道微生物的研究^[18-19]。

长江口是日本鳗鲡幼体溯河洄游的必经通路,本实验以 2022 年日本鳗鲡洄游汛期在长江口南汇东滩外侧获取的日本鳗鲡幼体为研究对象,对 V3~V4 区进行 16S rRNA 扩增子测序,首次研究长江口日本鳗鲡幼体肠道微生物的结构特征和潜在功能,并分析不同月份间日本鳗鲡幼体肠道菌群之间的差异性,研究日本鳗鲡幼体微环境稳态,为其苗种繁育及饵料研制提供参考。

1 材料和方法

1.1 样本的采集与处理

采样点位于长江口南槽航道内侧、南汇东滩外侧,水深在 6.5~8.5 m,布网范围为 30°48'00"N~30°53'00"N, 122°03'10"E~122°03'40"E (图 1)。在

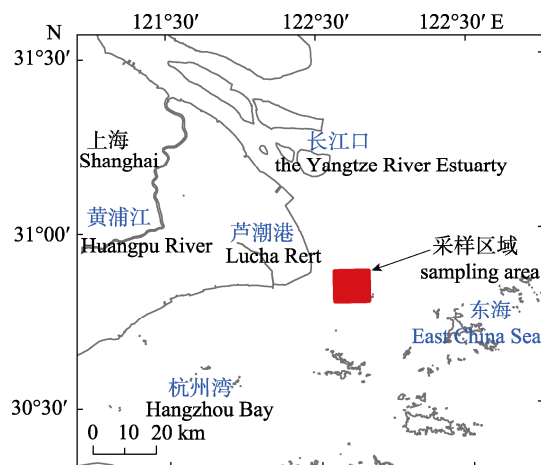


图 1 长江口日本鳗鲡幼体样本的采集区域
Fig. 1 Sampling area of *Anguilla japonica* larvae collected in the Yangtze River Estuary

2022 年 1—4 月的日本鳗鲡幼体汛期,温度范围为 7.5~15.0 °C,利用长江口常用的日本鳗鲡幼体捕捞张网—单桩框架定置张网逐月采集日本鳗鲡幼体,每月中旬在船上随机抽取约 100 尾样本放入双层密封袋,立即在-20 °C的冰箱中冷冻保存。

短暂冷冻保存后的样本送到实验室后解冻,用吸水纸吸去水分。用游标卡尺测量全长(total length, TL),精确至 0.01 mm;用电子天平称量体重(body weight, BW),精确至 0.1 mg。随后用体视显微镜观察每尾样本的体表色素分布,依据郭宏艺等^[8]对玻璃鳗体表色素发育过程的评判标准来判断发育时期,总体日本鳗鲡幼体包括 VA、VB 和 VIA1 期 3 个发育阶段, VIA1 期日本鳗鲡幼体较少,只存在于 4 月。每月随机挑选 VA 期和 VB 期各 10 尾作为肠道微生物分析的样本。用无菌水清洗鱼体表面,在无菌环境下剪除头部和尾部,保留躯干部作为分析材料。每月的 VA 期或 VB 期 10 尾鱼的躯干部合在一起,作为一个分析样本。在测序前放入 1 个 5 mL 离心管中,在-80 °C 冰箱里保存。每个月有 2 个不同发育时期的肠道微生物测序样本,供保存 8 个样本,其生物学信息见表 1。

1.2 DNA 的提取和肠道微生物多样性的测定

采用磁珠法(QJ 磁珠 DNA 提取试剂盒)提取鱼类肠道样本的 DNA,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,并用 Nanodrop 2000 对 DNA 的浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值进行测定,浓度和质量合格的样本由上海美吉生物医药科技有限公司完成 16S rRNA 基因扩增并测序。

采用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 通用引物对 DNA 样本中的 16S rRNA 基因 V3~V4 区域进行 PCR 扩增。20 μL PCR 反应体系为: 10 μL 2×Pro Taq, 引物 338F (5 mmol/L)和引物 806R (5 mmol/L)各 0.8 μL, 10 ng DNA 模板,然后用 ddH₂O 补足 20 μL。PCR 过程: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 29 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,切割回收。结果表明,产物目的条带大小正确,浓度合适,可进行后续实验。使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN

表 1 长江口日本鳗鲡幼体的色素发育时期、全长、体重

Tab. 1 The pigmentation stages, total length and body weight of *Anguilla japonica* larvae in the Yangtze River Estuary

编号 sampling number	采样时间 sampling date	尾数 number	色素发育时期 pigmentation stage	体长/mm total length		体重/mg body weight	
				range	mean±SD	range	mean±SD
JVA	2022-1-25	10	VA	52.04–57.55	55.21±1.73	92.2–137.9	117.8±14.3
JVB	2022-1-25	10	VB	55.05–57.13	56.05±0.76	102.7–135.0	118.0±11.9
FVA	2022-2-23	10	VA	54.27–59.93	56.53±1.89	100.4–137.2	117.5±14.1
FVB	2022-2-23	10	VB	54.62–59.38	56.51±1.49	93.3–136.5	115.5±14.2
MVA	2022-3-21	10	VA	55.58–58.20	56.68±0.94	119.0–143.4	130.6±8.0
MVB	2022-3-21	10	VB	54.27–60.14	57.29±2.04	98.5–162.9	130.3±19.6
AVA	2022-4-11	10	VA	54.54–59.27	56.98±1.53	98.9–150.6	128.7±14.7
AVB	2022-4-11	10	VB	53.42–61.58	57.07±1.96	95.5–126.8	117.4±15.4

公司)切胶回收 PCR 产物,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。使用 Illumina 测序专用的 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 试剂盒建立基因文库。构建好的文库通过 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序。

1.3 数据处理方法

1.3.1 OTU 聚类及物种注释 Miseq 测序得到双端序列数据(reads),根据 PE reads 之间的 overlap 关系,使用 Trimmomatic、FLASH 软件将成对的 reads 经过质控、拼接、过滤、去重、矫正序列方向等优化数据,再采用 Usearch (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>)软件对所得序列进行处理,并根据 97%相似度水平对序列进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对在 97%相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析。利用 QIIME 软件将其与 silva (Release128 <http://www.arb-silva.de>)数据库在不同分类水平上进行比对和注释,从而获得每个 OTU 所对应的物种分类信息。

1.3.2 Alpha 多样性 采用 Sobs 指数、Chao1 指数(S_{chao1})^[20]和 ACE 指数(S_{ace})^[21]计算菌群丰度, Simpson 优势度指数(D)^[21]和 Shannon-Wiener 多样性指数(H')^[22]计算菌群多样性状况,覆盖率指数(coverage, C)^[23]度量测序深度。公式如下:

$$S_{\text{obs}} = \text{实际测量出的 OTU 数} \quad (1)$$

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (2)$$

$$S_{\text{ace}} = S_{\text{abund}} + \frac{S_{\text{rare}}}{C_{\text{ace}}} + \frac{n_1}{C_{\text{ace}}} \gamma_{\text{ace}}^2 \quad (3)$$

$$D_{\text{simpson}} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \quad (4)$$

$$H'_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (5)$$

$$C = 1 - \frac{n_1}{N} \quad (6)$$

式中, n_1 为只含有 1 条序列的 OTU 数(如 singleton), n_2 为只含有 2 条序列的 OTU 数, n_i 代表含有 i 条序列的 OTU 数, N 为样本中出现的总序列数; S_{abund} 为含有超过 10 条序列的 OTU 数, S_{rare} 为含有不多于 10 条序列的 OTU 数, C_{ace} 表示所有低丰度(出现 ≤ 10 次)的物种中非 Singleton 的比例, γ_{ace}^2 为变异系数。

1.3.3 统计分析 使用 ArcGIS10.3 软件绘制采样点分布图。使用 R3.3.1 软件进行物种组成柱状图分析, R 语言工具制作稀释性曲线图、成分分析图、韦恩(Venn)图并进行分析。使用 Wilcoxon 秩和检验来比较各组之间的 Alpha 多样性指数差异, ANOSIM 检验来比较 VA 期组和 VB 期组肠道菌群的结构差异, $P < 0.05$ 表明差异显著。使用 PICRUST 菌群代谢功能预测工具对 OTU 丰度表进行标准化, 然后通过每个 OTU 对应的 Green Gene ID, 对 OTU 进行 COG 和 KEGG 功能注释, 从而获得 OTU 在 COG、KEGG 各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。

2 结果与分析

2.1 稀释性曲线

经过质控后, 8 个样本共获得有效序列 319967 条, 平均每个样本 39996 条。99.9% 的序列长度在 400~500 bp 之间, 平均长度为 425.99 bp。对所有序列进行 97% 相似水平聚类后得到 1467 个 OTU。8 个样本的 coverage 值均在 99.9% 以上, 说明序列未被检出的可能性小, 测序结果真实可靠。从图 2 可见, 测序数在 15000 以下时, 各样本实际观测到的 OTU 数(Sobs 指数)随着所测序列数的增加而快速增大, 也就是日本鳗鲡幼体肠道中有大量菌群被发现; 测序数大于 25000 时, 各样本 Sobs 指数曲线均趋于平缓, 说明此时的测序深度足以反映各个样本微生物群落的组成和多样性状况。

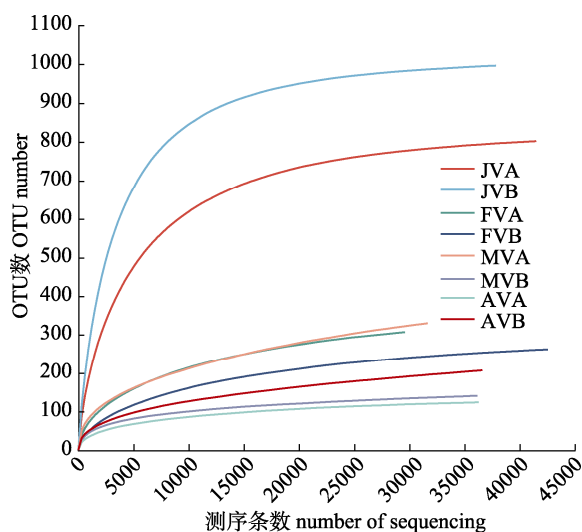


图 2 8 个日本鳗鲡幼体的肠道菌群稀释性曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of intestinal microbiota of 8 *Anguilla japonica* larvae

2.2 OTU 数量和样本间的分布

8 个日本鳗鲡幼体肠道微生物样本 JVA、JVB、FVA、FVB、MVA、MVB、AVA、AVB 测得的 OTU 数分别为 802、996、307、262、330、141、124、207 个, 平均每个样本 396 个。从 OTU 数的花瓣图(图 3)中可以看出, 8 个样本共有的 OTU 为 44 个; 样本 JVA 和 JVB 的特有 OTU 数较多, 分别为 238 个和 410 个; 而 MVA 和 MVB 较少, 分别为 9 个和 0 个。

将每月 2 个不同发育时期的肠道微生物测序结果组合在一起绘制成各月组间的韦恩图(图 4), 其中 1 月组(JV)的 OTU 数为 1339 个, 2 月组(FV)、3 月组(MV)和 4 月组(AV)分别为 417 个、347 个和 225 个, 可见 OTU 数随月份递增而明显减少, 1 月组是其他 3 个月组的 3.21~5.96 倍。4 月组共有的 OTU 数为 104 个, 这个数占 JV 组的 7.77%、FV 组的 24.94%、MV 组的 29.97%、AV 组的 46.22%。1—4 月组各自特有的 OTU 数分别为 820 个、57 个、17 个和 18 个。

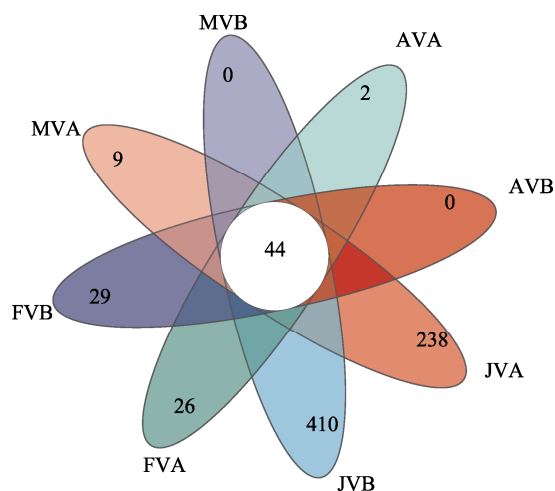


图 3 8 个日本鳗鲡幼体肠道菌群样本的 OTU 分布花瓣图

每个花瓣代表一个样本, 中间的数字代表所有样本共有的 OTU 数, 花瓣上的数字代表该样本的特有 OTU 数。

Fig. 3 Petal map of OTU distribution of intestinal microbiota community in 8 *Anguilla japonica* larvae. Each petal represents a sample, and the number in the middle represents the OTU shared by all samples. The number on each petal represents the unique OTU number of the sample.

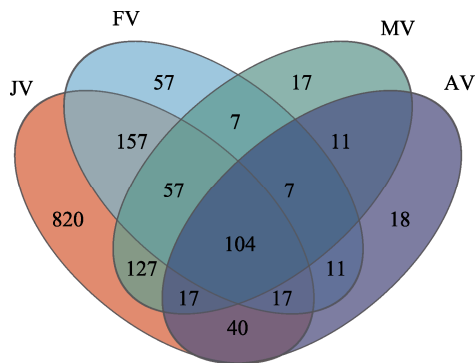


图 4 4 个月组日本鳗鲡幼体肠道菌群 OTU 数的韦恩图
Fig. 4 The Venn diagram of OTUs of intestinal microbiota of *Anguilla japonica* larvae in 4 month groups

2.3 Alpha 多样性分析

Sobs、Ace、Chao1 指数表征群落中物种的丰富度, Shannon-Wiener 和 Simpson 指数表征群落中物种的多样性。对 8 个长江口日本鳎幼体肠道微生物样本的 OTU 数作上述 Alpha 多样性指数分析, 结果发现各个样本间的指数差异较大。样本 JVB 的 Sobs、Ace、Chao1、Shannon 值最大, 分别为 996、1009.24、1020、4.36, Simpson 值较小, 为 0.08, 显示该样本的肠道微生物物种最丰富、

物种多样性最高。AVA 的 Sobs、Ace、Chao1 值最小, 分别为 124、145.17、137.64, 显示该样本的肠道微生物物种最贫乏。MVB 的 Shannon 值最小, 为 1.52, Simpson 值最大, 为 0.51, 显示该样本的肠道微生物物种多样性最低(图 5)。Wilcoxon 秩和检验结果也显示, 1 月组 JVA 和 JVB 两个样本的肠道菌群物种多样性均显著高于其他样本($P < 0.05$), 但不同月份中 2 个发育时期 VA 组和 VB 组的肠道微生物物种丰度和多样性差异并不显著($P > 0.05$)。

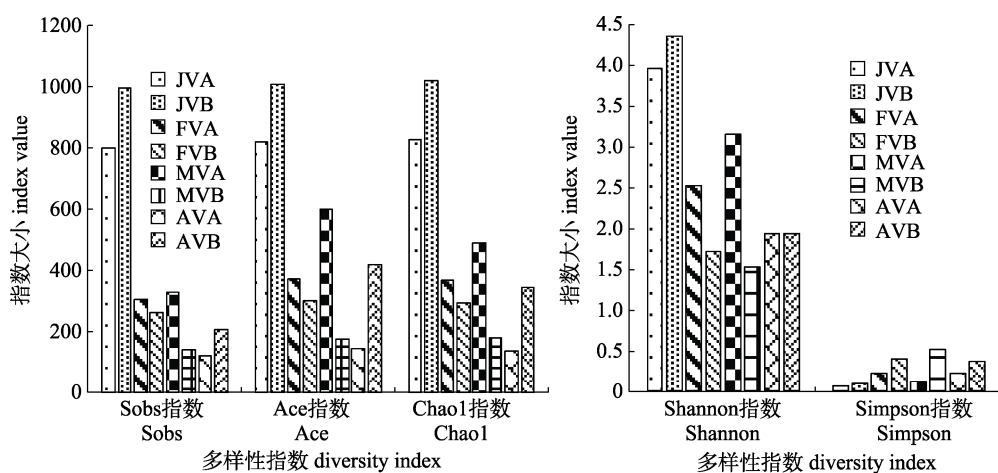


图 5 长江口日本鳎幼体肠道菌群的各类 Alpha 多样性指数

Fig. 5 The Alpha diversity indices of intestinal microbiota of *Anguilla japonica* larvae in the Yangtze River Estuary

2.4 肠道微生物的菌群组成

经与 silva 数据库比对, 8 个测序样本 1467 个 OTU 共鉴定出 51 门、140 纲、286 目、414 科、643 属、959 种肠道微生物。其中样本 JVB 含有的门最多, 有 49 门; 样本 MVB 含有的门最少, 仅 7 门; 每个样本平均包含 26 门。以月组为单位统计, 则 JV 组有 51 门、FV 组有 29 门、MV 组有 29 门、AV 组有 19 门, 平均为 32 门, 呈现出门数随月份递增而明显减少的趋势。以发育时相为单位统计, 则 VA 组有 45 门、VB 有 49 门, 平均为 47 门。

8 个样本合计, 变形菌门(Proteobacteria)平均占比为 81.24% (61.10%~90.98%), 拟杆菌门(Bacteroidota)平均占比为 10.61% (3.30%~38.69%), 其他占比较高的还有厚壁菌门(Firmicutes) (1.87%)、绿弯菌门(Chloroflexi) (1.62%)和放线菌门(Actinobacteriota) (1.51%)。但在不同样品中各门所占丰度存在较大差异, 拟杆菌门在样本 AVA 中占比最高, 为 38.69%; 绿弯菌门和放线菌门在

JVA 和 JVB 中占比较高, 在 JVA 中占比为 5.10% 和 5.03%, 在 JVB 中占比为 7.16%和 4.89% (图 6)。

在属水平上, 每个样本平均包含 229 属, 最多的 JVB 样本含有 473 属, 最少的 MVB 样本仅有 90 个属。以月组为单位进行统计, 则 1—4 月组分别为 596 属、251 属、229 属和 152 属, 平均每组为 307 属, 也呈现出属数随月份递增而明显减少的趋势。以发育时相为单位统计, 则 VA 组有 496 属、VB 有 542 属, 平均为 519 属。

8 个样本合计, 长江口日本鳎幼体肠道微生物优势菌群主要由嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属、无色杆菌属(*Achromobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等组成, 占比分别为 35.10%、16.75%、7.99%、4.82%、4.21%、3.86%、1.92%、1.83% (图 7)。其中, 嗜冷杆菌属在样本 FVB 中丰度占比达 80.72%; 假

单胞菌属在样本 MVA 和 MVB 中为第一优势菌属, 占比分别为 36.85% 和 72.93%; 黄杆菌属在样本 AVA 中为第一优势菌属, 占比为 38.32%; 还有少数属在个别样本中为优势菌群。

2.5 OTU 水平的 PCoA 分析

在 OTU 分类水平上, 运用 bray_curtis 距离算法对 8 个日本鳗鲡幼体菌群样本进行主成分分析 (PCoA), 结果显示主坐标轴 PC1、PC2 的解释度

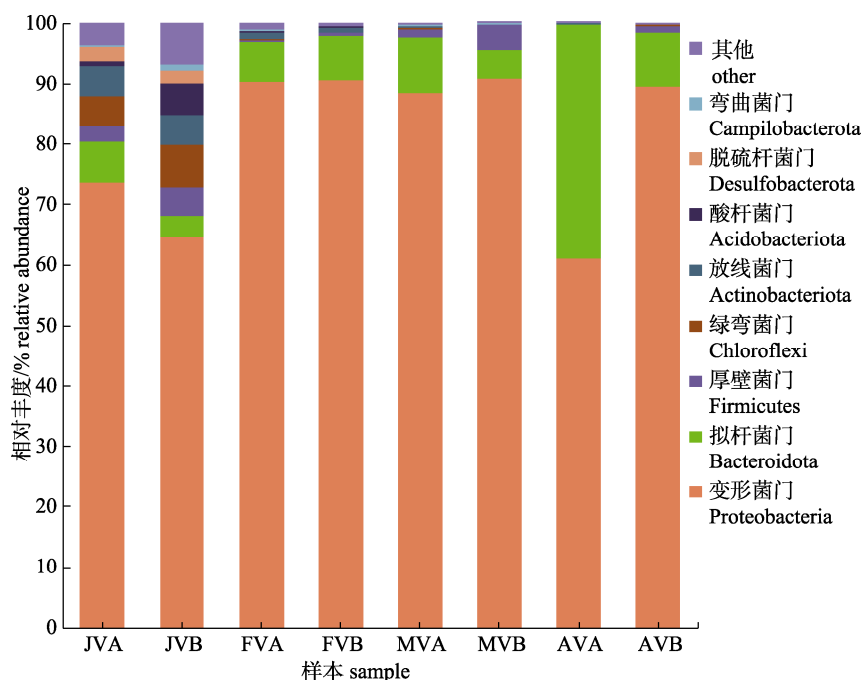


图 6 门水平的 8 个样本日本鳗鲡幼体肠道菌群组成

Fig. 6 Intestinal microbiota composition of 8 samples of *Anguilla japonica* larvae at the phylum level

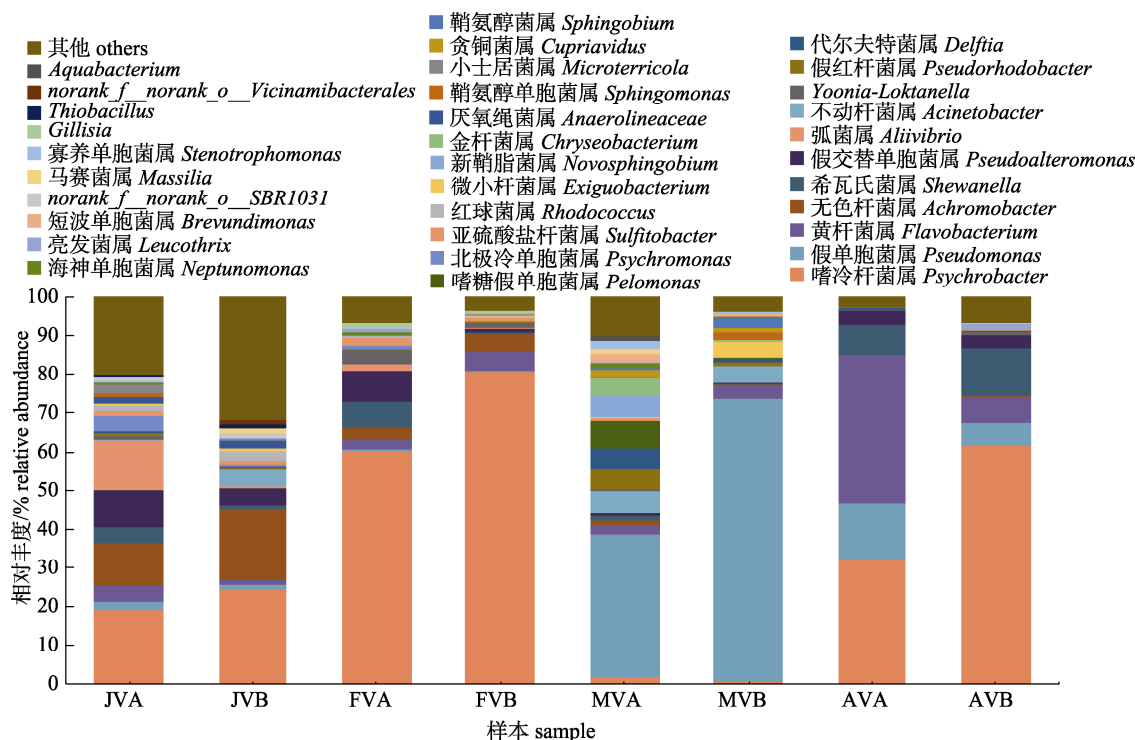


图 7 属水平的 8 个样本日本鳗鲡幼体肠道菌群组成

Fig. 7 Intestinal microbiota composition of 8 samples of *Anguilla japonica* larvae at the genus level

分别为 48.58%和 22.06%。图 8 中 1 月组和 3 月组的 2 个样本分别分布在两个象限中, 各自构成一个组群; 2 月组和 4 月组的 4 个样本比较接近, 说明这两组肠道微生物群落结构差异较小, 与上述 Alpha 多样性分析的结果相一致。1 月组日本鳎鲷幼体肠道微生物丰度和多样性较高, 3 月组在属水平上与其他月组差异较大。此外, 通过 ANOSIM 检验分析得出, 2 个发育时期 VA 组和 VB 组肠道菌群结构的差异不显著($R=-0.1562$, $P>0.05$)。

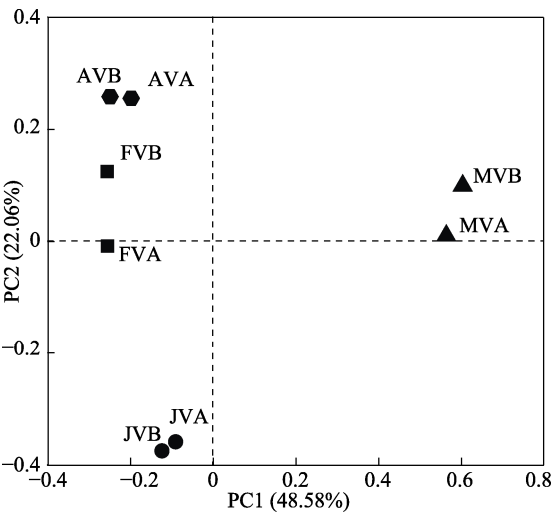


图 8 OTU 水平的 PCoA 分析图
Fig. 8 PCoA analysis chart at OTU level

2.6 日本鳎鲷幼体肠道菌群的功能预测

用 PICRUST 菌群代谢功能预测工具对 1467 个 OTU 进行功能注释, 在 KEGG pathway 1、pathway 2 和 pathway 3 水平上, 分别有 7 个、41 个和 304 个代谢功能途径。统计显示, 在 KEGG pathway1 水平上由 OTU 编码的基因中, 有 50.62%

与新陈代谢相关, 15.26%与遗传信息处理相关, 13.86%与环境信息处理相关, 此外有较少的 OUT 编码的基因与细胞进程、人类疾病和有机系统相关, 分别占比为 3.53%、1.31%和 0.79% (表 2)。

对 OTU 进行 COG 功能注释, 获得的 OTU 在 COG 功能水平上的注释信息及各功能在不同样本中的相对丰度信息如图 9 所示: 菌群编码的基因中与新陈代谢功能相关的主要有氨基酸转运与代谢(E, 占比 9.63%)、无机离子运输和代谢(P, 6.47%)、脂质代谢(I, 4.73%)及碳水化合物运输和代谢(G, 4.67%)等; 与遗传信息处理相关的主要有转录(K, 6.54%)及复制、重组和修复(L, 5.44%); 与环境信息处理相关的主要有能源生产和转换(C, 7.20%)及信号转导机制(T, 5.20%)。

3 讨论

3.1 长江口日本鳎鲷幼体肠道菌群的多样性和丰度

黄丽丽等^[24]分析了新疆 3 种冷水性肉食鱼类哲罗鱼(*Hucho taimen*)、细鳞鱼(*Qinling lenok*)和黑斑狗鱼(*Esox reicherti*)肠道微生物群落结构, 观测到 OTU 总数为 242 个, 包含 17 门。肖善势等^[25]分析了 3 种肉食性鱼类翘嘴鲇(*Culter alburnus*)、达氏鲇(*C. dabryi*)和红鳍原鲇(*Cultrichthys erythropterus*)肠道微生物群落结构, 观测到的 OTU 数分别为 407、666 和 392 个, 合计 1094 个 OTU 包含 23 门。Wu 等^[26]分析了湖北荆州养殖草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肠道微生物菌群结构, 观察到 6058 个 OTU, 包含 25 门。由此可见, 肉食性鱼类肠道微生物的 OTU 数较草食性鱼类的少, 但在门水平上差异不大。本研究在 8 个日

表 2 KEGG pathway 1 代谢通路统计
Tab. 2 Metabolic pathway statistics based on KEGG pathway 1

编号 number	功能 function	丰度 abundance	相对丰度/% relative abundance
1	新陈代谢 metabolism	13529961	50.62
2	遗传信息处理 genetic information processing	4078272	15.26
3	环境信息处理 environmental information processing	3704170	13.86
4	细胞进程 cellular processes	944410	3.53
5	人类疾病 Human diseases	349894	1.31
6	有机系统 organismal systems	209999	0.79
7	无分类 unclassified	3913209	14.64

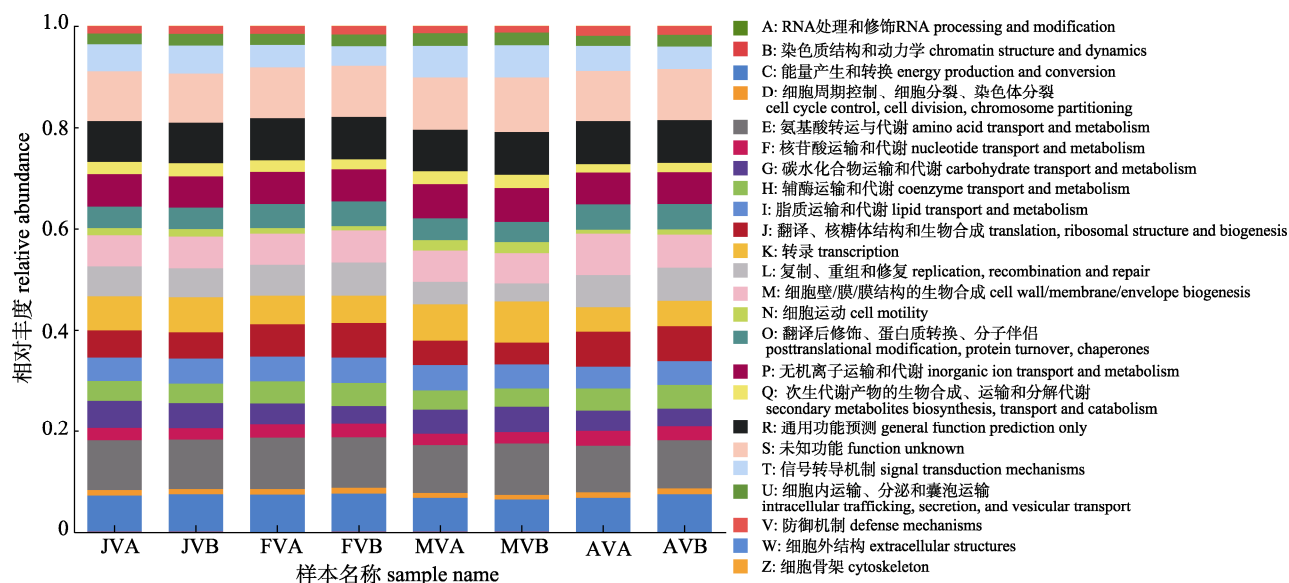


图 9 长江口日本鳗鲡幼体肠道菌群的 COG 功能分类统计

Fig. 9 The COG function classification of intestinal microbiota in Japanese eel larvae in the Yangtze River Estuary

本鳗鲡幼体肠道组织样本中发现的 OTU 总数为 1467 个, 共鉴定出 51 个门, OTU 数处于肉食性和草食性鱼类之间, 但门的数量明显高于上述研究结果, 也高于养殖欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 的 OTU 数(758 个)^[27]。但不同样本所包含的 OTU 数(141~996 个)和门数(7~49 个)差异也很大, 每样本平均包含 396 个 OTU 和 26 门, 并表现出随月份递增而明显减少的现象。

Alpha 多样性分析也显示, 1 月组两个样本的 Sobs 指数、ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数均显著高于其他月组 ($P < 0.05$), 表明微生物物种丰度和多样性更高。但 2 个发育时期 VA 组和 VB 组的肠道微生物物种丰度和多样性差异并不显著 ($P > 0.05$)。研究表明, 鱼类肠道微生物群落结构和多样性与其生长情况、生存环境以及食性等均有关^[28]。长江口日本鳗鲡幼体的日龄范围为 (122.0~190.0) d, 平均 (150.9±12.7) d, 孵化时间一般在 8—11 月^[29]。笔者推测造成 1 月组日本鳗鲡幼体肠道菌群丰度和多样性较高的原因, 可能是 1 月组的日本鳗鲡幼体从产卵场到长江口的洄游过程中经历了高温的夏季至低温的冬季, 而其他月份的日本鳗鲡幼体仅经历了温差相对较小的秋季至冬季或翌年春季。

3.2 长江口日本鳗鲡幼体肠道优势菌群

变形菌门是多种鱼类肠道菌群的主要微生物

类群^[30], 尤其在鱼类早期生命阶段占比更高, 如在养殖的梭鲈 (*Lucioperca lucioperca*) 早期生命阶段占 90% 以上^[31], 在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 早期发育阶段也占主导地位^[32]。但 Bertucci 等^[33]发现欧洲鳗成体的肠道菌群中变形菌门约占 37%, 厚壁菌门约占 30%, 放线菌门约占 16%; 王悦等^[34]发现花鳗 (*Anguilla marmorata*) 成体肠道菌群主要以梭杆菌门和厚壁菌门为主 (占 75% 以上); 刘海姿等^[15]发现美洲鳗白仔苗肠道菌群以厚壁菌门 (约占 83%) 和变形菌门 (约占 11%) 占优势。Zhu 等^[14]发现日本千叶山的日本鳗鲡成体肠道菌群主要以变形菌门 (后肠占比 37.24%, 前肠占 81.95%, 平均 55.37%) 和拟杆菌门 (前肠占比 9.16%, 后肠占比 56.98%, 平均 36.36%) 为主。本研究结果显示, 变形菌门是长江口日本鳗鲡幼体肠道中第一优势菌群, 8 个样本中占比在 61.10%~90.89%, 平均占 81.24%; 占比较高的还有拟杆菌门 10.61% (3.30%~38.69%)。这与许多鱼类及日本鳗鲡成体肠道菌群的研究结果接近, 但与鳗鲡属其他种类差异明显。

有研究表明, 草食性鱼类 [武昌鱼 (*Megalobrama amblycephala*) 草鱼] 的肠道中以纤维素降解菌——梭菌属 (*Clostridium*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 和纤毛菌属 (*Leptotrichia*) 为主; 肉食性 [鳊

(*Siniperca chuatsi*)、欧白鱼(*Alburnus alburnus*)]以乳酸菌和蛋白酶产生菌——盐单胞菌属(*Halomonas*)为主, 鲸杆菌属(*Cetobacterium*)也有较高比例; 杂食性鱼类[鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)]主要以梭菌属、鲸杆菌属、盐单胞菌属为主^[35]。但也有研究发现, 自然生境中的草鱼肠道中主要为不动杆菌属(*Acinetobacter*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)^[36], 养殖条件下的草鱼肠道中主要为鲸杆菌属和气单胞菌属(*Aeromonas*)^[36-37]; 野生肉食性鱼类(翘嘴鲇、达氏鲇和红鳍原鲇)肠道中以鲸杆菌属(26.30%)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*) (21.02%)和气单胞菌属(15.46%)为主^[25]; 杂食性鱼类(鲤)肠道中主要为乳酸菌属(*Lactobacillus* Beijerinck)、气单胞菌属和邻单胞菌属(>85%)^[38]。这表明尽管不同食性的鱼类其肠道菌群组成具有一定的规律性, 但不同研究所得结果差异也很大。

Hsu 等^[39]发现东山江的日本鳗鲡成体肠道优势菌属主要为缓生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、鲸杆菌属、梭菌属和邻单胞菌属; Zhu 等^[14]发现日本千叶山的日本鳗鲡成体肠道中主要由鞘脂单胞菌科、黄杆菌属、红杆菌属组成。本研究发现长江口日本鳗鲡幼体肠道菌群主要为嗜冷杆菌属(35.10%)、假单胞菌属(16.75%)、黄杆菌属(7.99%)、无色杆菌属(4.82%)和希瓦氏菌属(4.21%), 这与其他鱼类的肠道微生物群落不同, 也与日本鳗鲡成体的肠道菌群有很大差异。但肠道菌群中检测到了日本鳗鲡成体肠道所含的黄杆菌属和其他草食性鱼类所含不动杆菌属(占 1.83%)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)(占 0.39%), 特别是黄杆菌属在样本AVA 中为第一优势菌属, 占比达 38.32%。因此, 笔者推测长江口日本鳗鲡幼体的食性以肉食性为主, 也能消化一定的纤维素食物, 这与我我国河口鳗苗主要以浮游生物为食的研究结果相一致^[40-41]。

3.3 日本鳗鲡幼体肠道菌群的功能分析

通过 PICRUSt 软件对长江口野生日本鳗鲡幼体肠道菌群 COG 和 KEGG 功能注释预测发现, 日本鳗鲡幼体肠道中与新陈代谢功能相关的菌群丰度最高, 其中氨基酸转运与代谢、无机离子运输和代谢、脂质代谢和碳水化合物运输和代谢相关菌群占比较高。表明野生日本鳗鲡幼体肠道菌群

对宿主营养代谢有一定的影响^[42], 这与大多数鱼类肠道微生物功能组成的研究结果一致^[43]。由此推测, 日本鳗鲡幼体营养代谢过程中消化道内的氮氮浓度相对较高。目前, 高碳水化合物和高脂肪含量的高成本效益饲料被广泛应用于水产养殖^[44]。后续可针对营养代谢过程中日本鳗鲡幼体消化道中的核心菌群进行分离培养, 并针对性地在鳗苗养殖过程中在饵料中加入相应的益生菌。

参考文献:

- [1] Tsukamoto K. Oceanic biology: Spawning of eels near a seamount[J]. Nature, 2006, 439(7079): 929.
- [2] Tsukamoto K, Chow S, Otake T, et al. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific[J]. Nature Communications, 2011, 2: 179.
- [3] Xie G. Survey and prospect of studies on artificial propagation and rearing eel (*Anguilla japonica*) fry: A review[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2001, 16(1): 42-48. [谢刚. 鳗鲡苗种人工繁育的研究概况及其展望[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 42-48.]
- [4] Tanaka H. Progression in artificial seedling production of Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. Fisheries Science, 2015, 81(1): 11-19.
- [5] Guo H Y, Zhang X G, Zhang Y, et al. Effects of environmental variables on recruitment of *Anguilla japonica* glass eels in the Yangtze Estuary, China[J]. Fisheries Science, 2017, 83(3): 333-341.
- [6] Wang S K, Song C, Zhang T T, et al. Spatiotemporal distribution and catching status of elver (*Anguilla japonica*) in the Yangtze River Estuary[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(2): 171-182. [王思凯, 宋超, 张婷婷, 等. 长江口日本鳗鲡苗的时空分布与捕捞生产现状[J]. 水产学报, 2023, 47(2): 171-182.]
- [7] Xie Z L, Guo H Y, Tang W Q, et al. Age structure and growth characteristics at seaward migrating periods of *Anguilla japonica* in the Yangtze River Estuary[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(2): 245-254. [谢正丽, 郭弘艺, 唐文乔, 等. 长江口降海洄游鳗鲡的年龄结构与生长特征[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 245-254.]
- [8] Guo H Y, Zhang Y, Tang W Q, et al. Pigmentation stages and body proportions of *Anguilla japonica* glass eels at the Yangtze River Estuary[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 197-202. [郭弘艺, 张亚, 唐文乔, 等. 长江口日本鳗鲡幼体色素发育时相及其体型变化[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 197-202.]
- [9] Cahill M M. Bacterial flora of fishes: A review[J]. Microbial

- Ecology, 1990, 19(1): 21-41.
- [10] Wang A R, Ran C, Ringø E, et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(3): 626-640.
- [11] Meng X L, Nie G X. Advances of intestinal microbiota and lipid metabolism of fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(6): 1221-1229. [孟晓林, 聂国兴. 鱼类肠道菌群与机体脂质代谢关系研究进展[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1221-1229.]
- [12] Talwar C, Nagar S, Lal R, et al. Fish gut microbiome: Current approaches and future perspectives[J]. Indian Journal of Microbiology, 2018, 58(4): 397-414.
- [13] 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. [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.]
- [14] Zhu P, Wong M K S, Lin X, et al. Changes of the intestinal microbiota along the gut of Japanese Eel (*Anguilla japonica*)[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(4): 529-541.
- [15] Liu H Z, Liang Y, Zhai S W. Effect of different starter feeds on intestinal flora of *Anguilla rostrata* at elver stage[J]. Feed Research, 2021, 44(5): 51-55. [刘海姿, 梁英, 翟少伟. 不同开口饵料对美洲鳗鲡白仔苗肠道菌群的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(5): 51-55.]
- [16] Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [17] Di Bella J M, Bao Y G, Gloor G B, et al. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(3): 401-414.
- [18] Evariste L, Barret M, Mottier A, et al. Gut microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies[J]. Environmental Pollution, 2019, 248: 989-999.
- [19] Wang X F, Zhao Y F, Song Z F, et al. Application of high-throughput sequencing techniques for analyzing bacterial communities in pond-raised mud crab (*Scylla paramamosain*) intestine and its aquaculture environment[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(6): 1245-1253. [王贤丰, 赵艳飞, 宋志飞, 等. 应用高通量测序技术分析拟穴青蟹肠道及其养殖环境菌群结构[J]. 中国水产科学, 2017, 24(6): 1245-1253.]
- [20] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11: 265-270.
- [21] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148): 688.
- [22] Shannon C E. The mathematical theory of communication[J]. Bell Labs Technical Journal, 1950, 3(9): 31-32.
- [23] Lundin D, Severin I, Logue J B, et al. Which sequencing depth is sufficient to describe patterns in bacterial α - and β -diversity?[J]. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(3): 367-372.
- [24] Huang L L, Zhang Y, Zhou H, et al. Comparison of intestinal microbial diversity in cold-water fishes in Xinjiang by 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2018, 39(10): 138-144. [黄丽丽, 张艳, 周红, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序方法比较新疆冷水鱼肠道中微生物多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 138-144.]
- [25] Xiao S S, Zhang A J, Liu J D, et al. Analysis on intestine microbial community structure of three carnivorous fishes in Qianxia Lake, China[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2022, 35(3): 73-79. [肖善势, 张爱菊, 刘金殿, 等. 千峡湖三种肉食性鱼类肠道微生物群落结构分析[J]. 水产学杂志, 2022, 35(3): 73-79.]
- [26] 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.
- [27] Ye S, Ma D Y, Zhai S W. Revealing the difference of intestinal microbiota composition of cultured european eels (*Anguilla anguilla*) with different growth rates[J]. Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah, 2020, 72 (3): 1-12.
- [28] Yukgehnash K, Kumar P, Sivachandran P, et al. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish[J]. Reviews in Aquaculture, 2020: raq.12416.
- [29] Zhang Y. Study on pigmentation developmental stages and morphological characteristics and otolith microchemistry of Japanese eels larvae, *Anguilla japonica*, collected in Yangtze River Estuary[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [张亚. 长江口日本鳗鲡幼体的发育时相、形态特征和耳石化学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [30] Givens C E, Ransom B, Bano N, et al. Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species[J]. Marine Ecology Progress Series, 2015, 518: 209-223.
- [31] Dulski T, Zakęs Z, Ciesielski S. Characterization of the gut microbiota in early life stages of pikeperch *Sander lucioperca*[J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92(1): 94-104.
- [32] Gajardo K, Rodiles A, Kortner T M, et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research[J]. Scientific

- Reports, 2016, 6: 30893.
- [33] Bertucci A, Hoede C, Dassié E, et al. Impact of environmental micropollutants and diet composition on the gut microbiota of wild European eels (*Anguilla anguilla*)[J]. Environmental Pollution, 2022, 314: 120207.
- [34] Wang Y, Zhao P Y, Chen X H, et al. The comparative research on intestinal flora of *Anguilla marmorata* with different growth rates under intensive culture ponds condition[J]. Feed Industry, 2021, 42(4): 48-52. [王悦, 赵盼月, 陈学豪, 等. 精养池模式下不同生长速度花鳗鲡的肠道菌群比较研究[J]. 饲料工业, 2021, 42(4): 48-52.]
- [35] Liu H, Guo X W, Gooneratne R, et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24340.
- [36] Wang C, Ni J J, Yan Q Y, et al. Comparison of the intestinal bacterial communities between grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 868-875. [王纯, 倪加加, 颜庆云, 等. 草鱼与团头鲂肠道菌群结构比较分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 868-875.]
- [37] Zhang H X, Tang H S, Zang Y, et al. Microorganism's adaptation of crucian carp may closely relate to its living environments[J]. Microbiology Open, 2019, 8(3): e00650.
- [38] Li J, Ni J, Li J, et al. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(6): 1750-1760.
- [39] Hsu H Y, Chang F C, Wang Y B, et al. Revealing the compositions of the intestinal microbiota of three Anguillid eel species using 16S rDNA sequencing[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(7): 2404-2415.
- [40] Liu Y X, Xie Y H, Li B, et al. Preliminary study on the feeding habit of the upstream migratory elver of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in the estuary of northern Yellow Sea, China[J]. Fisheries Science, 1992, 11(2): 4-7. [刘义新, 解玉浩, 李勃, 等. 辽东半岛(黄海北部)溯河鳗苗食性的初步研究[J]. 水产科学, 1992, 11(2): 4-7.]
- [41] Fu L J, Li B, Liu Y X. Preliminary study on feeding habits of eel fry in coastal estuaries of China[J]. Reservoir Fisheries, 1993, 14(4): 16-17. [富丽静, 李勃, 刘义新. 中国沿海河口地区鳗苗食性的初步研究[J]. 水利渔业, 1993, 14(4): 16-17.]
- [42] Lyons P P, Turnbull J F, Dawson K A, et al. Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(2): 347-363.
- [43] Luo M K, An R, Fu J J, et al. Comparative analysis of the gut microbiota in bighead carp under different culture patterns[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(2): 1357-1369.
- [44] Xie D Z, Yang L P, Yu R M, et al. Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture, 2017, 479: 696-703.

Study on the intestinal microbial community of Japanese eel larvae in the Yangtze River Estuary based on 16S rRNA high-throughput sequencing

CHANG Yajuan¹, TANG Wenqiao^{1,2}, GUO Hongyi^{1,2}

1. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The aims of this study were to analyze the structure and diversity of intestinal microorganisms in wild *Anguilla japonica* eel larvae from the Yangtze River Estuary and to explore the function of these intestinal microorganisms. MiSeq 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to sequence the 16S rRNA of microorganisms in wild eel larvae at different pigment development stages from January to April. We then counted the number of operational taxonomic units (OTU) of intestinal microorganisms in the samples, analyzed species composition, abundance, and alpha diversity, and predicted the function of these intestinal microorganisms. A total of 1467 OTUs were identified from the Japanese eel larvae samples, with an average of 396 per sample; these microorganisms were determined to belong to 51 phyla, 140 classes, 286 orders, 414 families, 643 genera, and 959 species. Each sample had an average of 26 phyla and 229 genera; however, a significant decrease in this diversity was observed with increasing months. At the phylum level, the dominant microflora were Proteobacteria (81.33%) and Bacteroidota (10.61%). At the genus level, the dominant bacterial groups were *Psychrobacter* (35.10%), *Pseudomonas* (16.75%), *Flavobacterium* (7.99%), *Achromobacter* (4.82%), and *Shewanella* (4.21%), which differed from the intestinal microbial communities observed in other fishes. The abundance and diversity of intestinal microflora in eel larvae from the January group were significantly higher than those in other months ($P < 0.05$). Nonetheless, there was no significant difference in the structure and diversity of the intestinal microbial community among the other three groups or between the VA and VB stages of eel larvae at different pigment development stages ($P > 0.05$). According to KEGG path annotation, it was predicted that most of the genes encoded by the intestinal microflora of Japanese eel larvae were related to metabolism; further, the relative abundance of amino acid transport and metabolic functional groups was high. The composition of microorganisms in the intestinal tract of Japanese eel larvae is complex; therefore, the analysis of these intestinal microorganisms and their corresponding functions helps develop our understanding of the influence of intestinal microflora on *Anguilla japonica* feeding, thereby providing a theoretical basis for further studies on fish diet.

Key words: Yangtze River Estuary; *Anguilla japonica*; 16S rRNA; intestinal microbiota; dominant flora; function prediction

Corresponding author: TANG Wenqiao. E-mail: wqtang@shou.edu.cn