

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14456

大菱鲂仔稚鱼发育早期肠道菌群结构形成的影响因素

史秀清^{1,2}, 王印庚², 张正², 廖梅杰², 李彬², 张述智³, 李华¹

1. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛中仁药业有限公司, 山东 青岛 266329

摘要: 为研究鱼类发育早期肠道菌群结构的演变过程及影响因素, 运用高通量测序技术, 分析了处于不同发育阶段的大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼肠道、受精卵、不同类型的饵料和水源中的菌群结构, 以及它们之间的相关性。结果显示, 以不同的 OTU (Operational Taxonomic Units, 可操作分类单元)作为分类依据, 发现大菱鲂仔稚鱼的肠道菌群结构在开口摄食后不久已趋于稳定, 其优势菌与受精卵所携带的细菌关联较大。并且在发育时期不同的仔稚鱼, 这一菌群的结构非常稳固, 几乎不受水和饵料中优势细菌的影响而发生改变。乳球菌属的 *Lactococcus piscium* 菌株一直是仔稚鱼肠道中的优势菌种, 在不同发育时期的优势度高达 45%~65%。本研究还发现, 大菱鲂仔稚鱼肠道可能对定植的菌种具有选择性, 一些水环境和饵料中的非优势菌, 如 *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Carnobacterium* sp. 等细菌也会定植于肠道, 成为大菱鲂肠道中的次优势菌。

关键词: 大菱鲂; 苗种繁育; 肠道菌群; 影响因素; 高通量测序

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-1075-09

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)自欧洲引入中国以来, 经过 20 多年的发展, 已经成为我国陆基工厂化海水鱼类养殖的主要品种。但在其产业迅速发展的过程中, 新的疾病不断出现, 成为制约产业发展的主要问题之一。特别是近几年来, 作为产业链上游的苗种培育受病害困扰尤为突出, 已经严重影响了我国大菱鲂苗种培育的成活率和育成质量。因此, 对苗种培育期的病害进行科学和有效的防控, 对整个产业的健康发展意义重大。

鱼类的肠道菌群在其生长发育过程中, 参与了机体的消化、吸收、免疫等很多重要的生理活动, 与鱼类的健康生长关系密切^[1-2]。有研究表明, 在鱼类发育早期的仔稚鱼阶段, 肠道菌群甚至参与了机体的非特异免疫, 在抵御病原菌入侵方面也发挥了极为重要的作用^[3-5]。因此, 加强苗种培

育时期的肠道菌群研究, 有可能为仔稚鱼时期的疾病防控提供新的技术思路。而仔稚鱼开口摄食后的一段时期内, 被认为是鱼类肠道菌群形成的关键时期。这一时期内, 环境及饵料中的细菌会进入仔稚鱼肠道中, 适合的细菌种类会逐步定植并形成最初的肠道菌群结构^[6-7], 此时仔稚鱼的肠道细菌数量会急剧增加^[8]。水环境和饵料中的细菌被认为是影响鱼类肠道菌群的最主要因素, 长期投喂不同类别的饵料会造成鱼类肠道菌群结构的显著差异^[9], 而水中的细菌种类对鱼类早期肠道菌群结构的形成也至关重要^[10-11]。在人工养殖的情况下, 水质条件可控、饵料来源单一, 这为深入研究鱼类早期肠道菌群的形成过程提供了便利条件。掌握微生物菌群定植鱼类肠道的种类及其客观规律, 既可以深入解析肠道菌群在鱼类生

收稿日期: 2014-11-07; 修订日期: 2015-01-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302206); 中央级公益性基本科研业务费专项资金项目(黄海水产研究所)(20603022013006).

作者简介: 史秀清(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事海水鱼类微生态研究. E-mail: xiuqing_shi@163.com; Tel: 0532-85817991

通信作者: 张正(1979-), 男, 博士, 副研究员. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

长发育过程中的生理作用,也会为养殖生产中更为科学和规范地防控疾病提供参考。

本研究以工厂化繁育的大菱鲃仔稚鱼为研究对象,通过对不同发育时期的仔稚鱼进行取样,并采集同一时期养殖池水源和投喂的不同饵料样本,用高通量测序方法分析了它们的菌群结构及相关性,希望借此解析人工繁育条件下大菱鲃仔稚鱼肠道菌群的定植过程,并阐明影响仔稚鱼肠道菌群结构形成的关键因素,以期优化现有大菱鲃苗种繁育生产工艺奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所分析的样本于 2013 年春季取自山

东烟台某大菱鲃繁育场。依据大菱鲃仔稚鱼不同发育阶段及投喂饵料的不同,分别取受精卵和 5、9、11、13、15、17、21、25、27、33、39 日龄的大菱鲃仔稚鱼样品进行实验分析。取样时设置平行样,选取同一车间同一批次的两个不同养殖池(标记为 A 和 B)分别进行取样,两组仔稚鱼样品分别标记为 fish A 和 fish B。每次取样时间设定为当日末次投喂之后 8 h,以确保所取仔稚鱼肠道中无大量食物。

每次对仔稚鱼取样的同时,也对当天投喂的生物饵料和水样进行取样。依据仔稚鱼的不同发育时期(图 1),所采集的饵料样本包括小球藻液、轮虫、卤虫和颗粒配合饲料。所采集水样为未进入养殖池的进水管出水口水样。

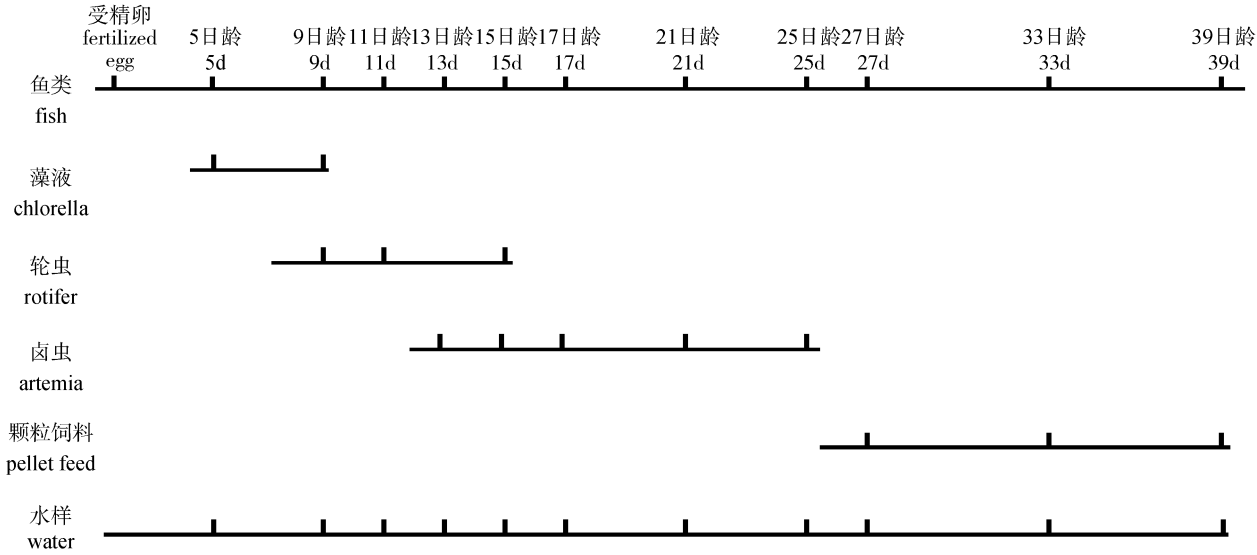


图 1 不同发育时期的饵料投喂和取样时间示意图

Fig.1 Bait feeding and sampling time at different developmental periods

1.2 样品处理

将现场采集的受精卵和仔稚鱼样品,先用灭菌海水浸泡 1 h,再用 10 mg/L 的聚六亚甲基胍浸浴 10 min,之后用无菌生理盐水冲洗鱼体数次,冲洗后的受精卵直接装入无菌离心管中,而仔稚鱼置于无菌培养皿中,在解剖镜下小心摘取全部肠道之后再装入无菌离心管中,均标记好后放入液氮保存。由于 9 日龄之前仔稚鱼鱼体较小,则将仔稚鱼按上述过程充分消毒后整体装入无菌离心管中,放入液氮保存。

生物饵料(小球藻、轮虫、卤虫)用无菌滤纸收集,用无菌海水滴洗两次后放入无菌离心管,标记好后放入液氮保存。颗粒饲料则用无菌药匙收集少许样品直接装入离心管中置于液氮保存。水样用无菌采水瓶直接收集,用孔径为 0.22 μm 无菌滤膜过滤 2 L 后,剪碎滤膜放入无菌离心管中同样置于液氮中保存。

1.3 细菌总 DNA 的提取

从液氮中取出样品,在无菌条件下自然化冻,取出离心管中的样本并充分剪碎,再用无菌研磨

棒进行反复研磨使样品均质化后,用 OMEGA 公司的 Soil DNA Kit 试剂盒提取样品中的细菌总 DNA。

1.4 高通量测序分析

将按 1.3 所述方法提取的细菌总 DNA,扩增 16S rDNA 序列的 V3~V5 可变区,引物序列为 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'和 5'-CCTACGGAGGCAGCAG-3'。扩增每个样本的引物序列前均加入长度为 8 个碱基的不同碱基标签,以标记不同的样本。PCR 的反应体系为:含 15 mmol/L MgCl₂的 10×Buffer 10.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 上下游引物各 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 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 69℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 共 30 个循环; 72℃延伸 10 min。扩增好的 DNA 序列,经琼脂糖电泳检测阳性后交由杭州联川生物技术有限公司用 PTS-454 高通量测序技术进行序列测定和分析。

为了便于对测序结果中的菌种、菌属进行更好的分析,对所有序列进行 OTU(Operational Taxonomic Unit, 可操作分类单元)的划分,一般在相似度为 97%的水平下进行生物信息学的统计分析。采用目前最常用的 MOTHUR 软件以输入命令的方式对高通量测序得到的数据进行统计和分析,并在此基础上,再结合 EXCEL 软件及 BLAST 同源性比对将所得数据进行进一步的处理。在本研究中,定义 1 个 OTU 为碱基差异小于 3%的序列群,并且一种细菌与 1 个 OTU 相对应。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果的数据统计

对各样品的高通量测序的有效序列统计见表 1。从表 1 可以看出,大菱鲃仔稚鱼不同发育时期饵料和水环境中的 OTU 数量差异较大。其中,小球藻中的细菌种类最少,有 200~300 种;轮虫和卤虫中的细菌种类有所增加,有 300~500 种;而颗粒饲料中的细菌种类最多,达到了 700~900 种。相比较而言,水环境中的细菌种类则表现了一种不规律的变化,整个取样期间在 600~1900

种波动。

另外,各样品中大约 50%的 OTU 仅有一条有效序列,通过结合样品中的有效序列总数进行分析,本次所采集的大菱鲃仔稚鱼、饵料和水样中可能存在占据明显优势生态位的细菌种类。

2.2 各样品中优势细菌的丰度及相关性分析

对各样品中优势度最高的前 10 位 OTU 进行丰度分析,分别计算它们在各个样品总 OTU 数量中所占的相对比例,根据它们之间的相对比例值构建了图 2。从图 2 可以看出,实验所采集的大菱鲃仔稚鱼、生物饵料、颗粒饲料和水样中都存在明显的优势菌群,其中 OTU12286、OTU5381、OTU17674、OTU16334、OTU16340 和 OTU12929 等所代表的几种细菌的数量总和在不同发育时期的大菱鲃仔稚鱼肠道中所占的相对比例约在 70%~80%。

进一步的对比分析发现,大菱鲃仔稚鱼的肠道菌群结构在不同发育时期并没有表现出明显的差异,并且与水和饵料中的菌群结构没有表现出明显的相关性。其中,OTU12286 所代表的细菌在各个时期大菱鲃仔稚鱼肠道中所占的比例一直高达 60%左右,是肠道中的绝对优势菌种。而 OTU12286 也是未孵化受精卵所携带的优势细菌之一,但在大多数的饵料和水样样品中,并没有作为优势菌出现。此外,饵料和水样中的绝大部分优势细菌并不是大菱鲃仔稚鱼肠道中优势度最高的前 10 种细菌。

2.3 各样品中优势细菌的种类分析

将各样品中优势度相对较高的细菌的 16S rDNA 序列提交 NCBI 的 16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea)数据库中进行 BLAST 同源性比对,选取比对结果中相似度最高的已知菌株序列作为参考菌株,再结合利用 RDP classifier 得到的每个 OTU 的物种分类信息,将各样品中的优势菌种汇总(表 2)。

通过比对发现,以 NCBI 的数据库作为参考,本次实验的大菱鲃仔稚鱼肠道、生物饵料、颗粒饲料和水样样品中占据明显优势生态位的细菌种类几乎完全不同。藻液中的优势菌为 *Stanieria* sp.

表 1 大菱鲆仔稚鱼不同发育时期各样品中高通量测序数据统计
Tab.1 The statistic result of high-throughput sequencing data of each sample at different developmental stages of larval *Scophthalmus maximus*

取样时间 sample time	样品来源 sample	有效序列总数 total numbers of valid sequence	总 OTU 数 total OTUs	仅有单一序列的 OTU 数 the number of OTUs with unique sequence	取样时间 sample time	样品来源 sample	有效序列 总数 total numbers of valid sequence	总 OTU 数 total OTUs	仅有单一序列的 OTU 数量 the number of OTUs with unique sequence
0 日龄 0 day	受精卵 fertilized egg	5263	328	173	5 日龄 5 day	小球藻 chlorella	8211	226	102
9 日龄 9 day	小球藻 chlorella	7201	251	131		水样 water	5464	782	434
	轮虫 rotifer	4887	547	243		fish A	6013	418	229
	水样 water	5837	850	470		fish B	3412	343	208
	fish A	5686	523	299	11 日龄 11 day	轮虫 rotifer	4773	461	210
	fish B	6737	463	248		水样 water	5069	648	358
13 日龄 13 day	卤虫 artemia	5296	331	179		fish A	6506	422	210
	水样 water	6697	1171	677		fish B	6015	475	263
	fish A	5897	477	278	15 日龄 15 day	轮虫 rotifer	6977	526	251
	fish B	4828	369	192		卤虫 artemia	5384	417	250
17 日龄 17 da	卤虫 artemia	4474	521	268		水样 water	8672	1825	926
	水样 water	5030	1116	630		fish A	6088	502	300
	fish A	5539	671	387		fish B	5348	430	227
	fish B	5684	667	339	21 日龄 21 day	卤虫 artemia	6872	240	100
25 日龄 25 day	卤虫 artemia	6438	372	187		水样 water	5757	1293	719
	水样 Water	7139	1318	763		fish A	7385	641	353
	fish A	7007	551	302		fish B	6421	566	334
	fish B	8577	910	531	27 日龄 27 day	颗粒饲料 pellet feed	6826	710	363
33 日龄 33 day	颗粒饲料 pellet feed	7597	812	374		水样 water	7904	1629	955
	水样 water	9086	1683	979		fish A	6442	482	291
	fish A	7499	684	423		fish B	5970	561	337
	fish B	6958	871	539	39 日龄 39 day	颗粒饲料 pellet feed	8354	900	428
						水样 water	7151	1717	1002
						fish A	5940	552	325
						fish B	4674	539	352

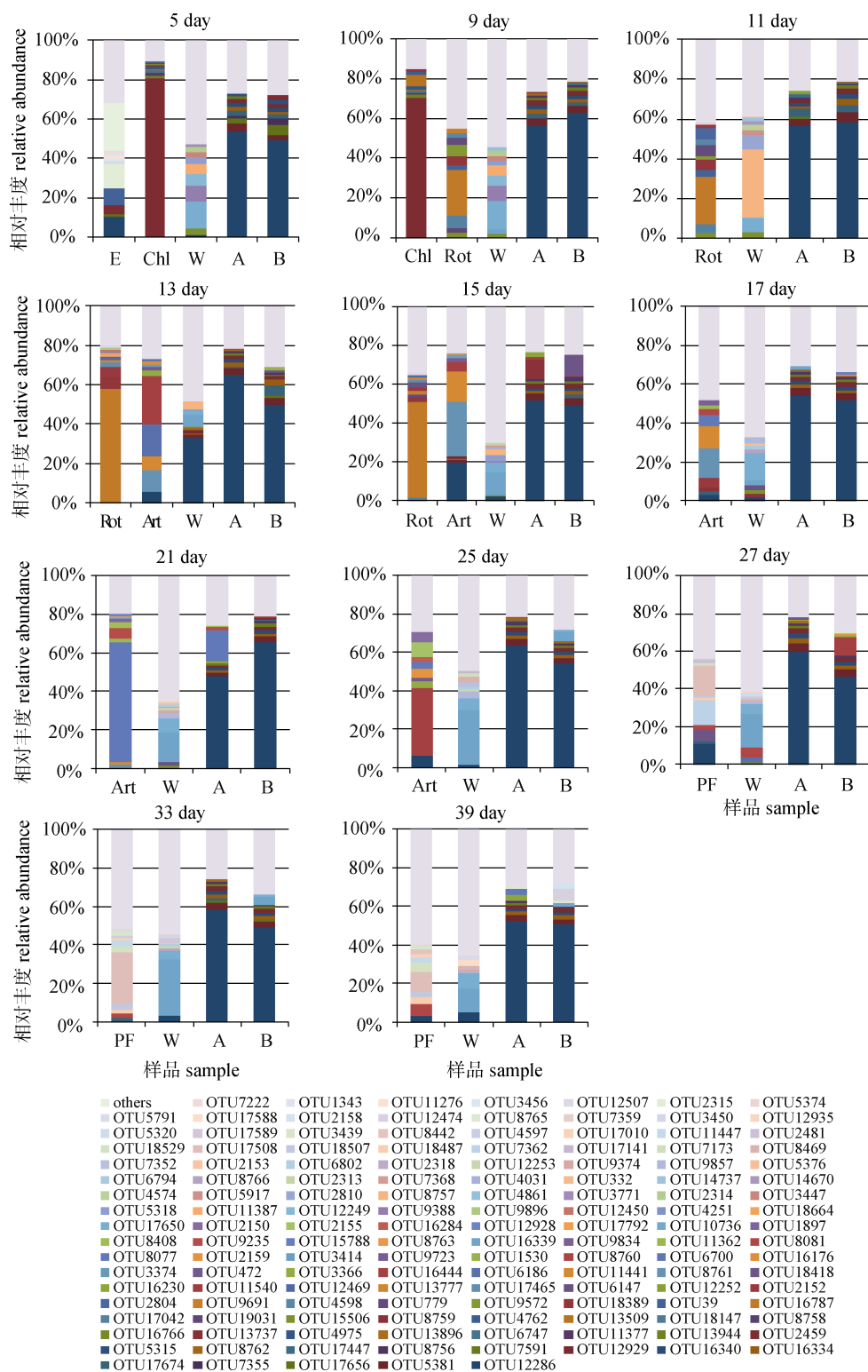


图 2 大菱鲷仔稚鱼不同发育时期各样品的菌群相似性分析

E: 受精卵; Chl: 小球藻液; Rot: 轮虫; Art: 卤虫; PF: 颗粒配合饲料; W: 进水口水样; A: A 仔稚鱼消化道; B: B 仔稚鱼消化道。
横坐标轴表示不同的样品; 纵坐标轴表示各样品中优势度最高的前 10 位 OTU 的相对丰度。

Fig.2 The microflora similarity analysis of samples at different developmental stages of larval *Scophthalmus maximus*
E: fertilized egg; Chl: chlorella; Rot: rotifer; Art: artemia; PF: pellet feed; W: the water sample of intake; A: the gastrointestinal tract of larval fish A; B: the gastrointestinal tract of larval fish B.

The abscissa axis represents different samples; the ordinate axis represents the relative abundance of the former ten OTUs of each sample.

表 2 大菱鲆仔稚鱼不同发育时期各样品中优势 OTU 的 BLAST 比对结果

Tab.2 The BLAST alignment results of dominant OTUs at different developmental stages of larval *Scophthalmus maximus*

优势 OTU 来源 dominance OUT source	编号 serial number	优势 OTU 的相对比例范围/% range of dominance OTU percentage	NCBI 中相似菌种 the closest strain in NCBI	NCBI 中存取号 the accession number in NCBI
受精卵 egg	2315	12.7	<i>Tenacibaculum soleae</i>	NR_042630.1
	12286	10.4	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
藻液 chlorella	2459	70–80 (5、9 日龄 5, 9 days)	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	NR_102468.1
	16787	20–60 (9–15 days)	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	NR_074155.1
轮虫 rotifer	18389	3–6 (9–15 days)	<i>Mycoplasma muris</i>	NR_044664.2
	2152	2–6 (11–15 days)	<i>Vibrio anguillarum</i>	NR_074153.1
	17042	1–7 (9, 11, 15 days)	<i>Psychroflexus lacisalsi</i>	NR_112778.1
	8761	1–29 (13–21 days)	<i>Serratia proteamaculans</i>	NR_074820.1
卤虫 artemia	11441	1–16 (13–21 days)	<i>Serratia proteamaculans</i>	NR_074820.1
	8077	3–63 (17–25 days)	<i>Vibrio proteolyticus</i>	NR_113610.1
	16444	5–36 (13, 15, 25 days)	<i>Alteromonas macleodii</i>	NR_114053.1
	12286	3–20 (13, 15, 17, 25 days)	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
	16339	1–30 (9, 13–39 days)	<i>Rhodothalassium salexigens</i>	NR_117059.1
水样 water	17650	1–15 (5–39 days)	<i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>	NR_044502.1
	8757	3–35(11–15 days)	<i>Colwellia asteriadis</i>	NR_116385.1
	12286	1–33(5, 13–17, 25, 33, 39 days)	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
	15506	1–4(5–21 days)	<i>Lentibacter algarum</i>	NR_108333.1
	17508	10–28(27–39 days)	<i>Myroides marinus</i>	NR_117408.1
颗粒饲料 pellet feed	8081	2–7(27–39 days)	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	NR_114188.1
	18529	1–5(27–39 days)	<i>Kurthia zopfii</i>	NR_119003.1
	12286	3–11(27, 39 days)	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
	12286	46–66(5–39 days)	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
肠道 gastrointestinal	5381	2–5(5–39 days)	<i>Pseudomonas brenneri</i>	NR_025103.1
	16334	1–4(5–39 days)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	NR_102871.1
	16340	1–3(5–39 days)	<i>Pseudomonas lundensis</i>	NR_024704.1
	12929	1–3(5–39 days)	<i>Carnobacterium gallinarum</i>	NR_042093.1
	7591	1–2(5–39 days)	<i>Lactococcus piscium</i>	NR_043739.1
	8756	1–2(9–39 days)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NR_114074.1

细菌, 轮虫中主要为 *Ehrlichia* sp.细菌, 卤虫中主要为 *Serratia* sp.、*Alteromonas* sp.、*Vibrio* sp.和 *Lactococcus* sp.细菌, 颗粒饲料中主要是 *Myroides* sp.细菌, 水样中主要为 *Rhodothalassium* sp.、*Colwellia* sp.和 *Lactococcus* sp.细菌, 而乳球菌属的 *Lactococcus piscium* 细菌在仔稚鱼的肠道中占据了绝对优势地位, 占有比例达到了 45%~65%, *Pseudomonas* sp.、*Streptococcus* sp.、*Carnobacterium* sp.和 *Acinetobacter* sp.的细菌虽然占有比例较小, 但也一直存在于仔稚鱼肠道中。

此外, 不同时期的饵料和水样中的优势菌种

也一直处于动态变化之中。如 11 日龄水样中的最优势菌种为 *Colwellia* sp.细菌, 至 39 日龄则变为 *Rhodothalassium* sp.细菌; 卤虫中的优势细菌波动最为明显, 从 13 日龄至 25 日龄优势菌种的种类和相对比例都发生了较大的变化。

3 讨论

动物消化道菌群在机体生长中发挥的重要作用越来越受到关注, 对其结构和功能的研究成为近期生命科学的研究热点之一^[1, 4, 12–13]。对于鱼类而言, 由于消化道与生活的水环境直接相通, 因

此其消化道菌群的结构更容易受到环境菌群的影响。鱼类发育早期的仔稚鱼阶段是鱼类消化道菌群形成的关键阶段,在仔稚鱼开口摄食以后,肠道中的菌群存在着一定的定植和演替过程,不同发育时期的肠道细菌在数量上也差异较大^[14-16]。而这一时期的消化道菌群对鱼类的生理意义更为重要,不仅参与了食物的消化和吸收^[17-19],而且在抵御病原菌入侵方面也可能发挥了一定的免疫功能^[20-21]。然而,对这一菌群结构从无到有的形成过程和动态演替现有文献却少见报道。

在早期以传统微生物培养为主要方法的研究中,有学者对大菱鲆仔稚鱼期间的消化道菌群结构和来源也进行过研究。英国学者对大菱鲆仔稚鱼肠道菌群进行研究发现,开始摄食饵料后肠道菌群数量迅速上升,当开始投喂卤虫时弧菌属细菌逐渐占据优势地位^[22],并且消化道菌群的主要来源是所摄取的鲜活饵料而非水中的细菌^[23]。西班牙学者也有类似的发现,大菱鲆1~90日龄的仔稚鱼肠道优势菌群也为弧菌属细菌,肠道菌群的优势菌与鲜活饵料中菌群的相似度较高^[24]。在本研究中,采用高通量测序方法对人工繁育生产中不同发育时期的大菱鲆仔稚鱼肠道及饵料、水环境中的菌群进行了对比分析。研究发现,大菱鲆仔稚鱼在刚刚开口摄食时,消化道菌群结构就已基本形成,此后在发育过程中经历轮虫、卤虫和颗粒配合饲料等不同的饵料期,尽管不同的饵料及水样中的菌群存在较大差异,但仔稚鱼的肠道菌群结构并没有发生明显的改变。这说明大菱鲆仔稚鱼消化道的菌群结构具有高度的保守性,似乎很难受到饵料和水环境中优势菌群的影响。将仔稚鱼肠道中的优势菌种序列提交NCBI数据库进行比对后发现,本研究所分析的大菱鲆仔稚鱼肠道菌群优势菌种不是弧菌属细菌,与国外学者的研究结果存在明显的不同。

深入分析研究中大菱鲆仔稚鱼样品消化道菌群的来源发现,其结构形成与受精卵携带的细菌关联紧密,编号为OTU12286所代表的菌株在受精卵携带菌群中的相对优势度为10.4%,而在此后不同时期的大菱鲆仔稚鱼肠道中其优势度高达

45%~65%,是仔稚鱼肠道优势菌的主要来源。而作为肠道中次优势菌的OTU16334、OTU16340、OTU12929等菌株则没有与受精卵所携带的、饵料和水环境中的菌群表现出明显的相关性。通过以上数据推断,影响大菱鲆仔稚鱼时期肠道菌群结构形成的主要因素是受精卵所携带的细菌,此后随着仔稚鱼的发育,饵料或环境中的一些非优势菌极有可能定植肠道并逐渐成为肠道中的次优势菌。这一现象也说明,大菱鲆仔稚鱼时期的肠道可能对定植菌种具有高度的选择性。

近年来,益生菌作为一种绿色、环保的多功能饲料添加剂,已成为国内外水产养殖业中研究和应用的焦点^[25-29]。在我国,添加益生菌是目前大菱鲆育苗生产中防控疾病、提高成活率较为常见的做法。但从本研究结果分析,益生菌的菌种选择和投入工艺有待深入研究。另一方面,本次实验样品采集的是1~39日龄的大菱鲆,这期间经历了轮虫、卤虫和颗粒饵料等不同饵料期,并且水环境中的优势菌群也发生了变化,但大菱鲆仔稚鱼肠道菌群的结构却是非常稳固的,前后并没有发生明显的结构性改变。由此假设,大菱鲆的肠道菌群结构一旦形成,就基本不会受环境和饵料菌群的影响。但在后续商品鱼养成过程中,大菱鲆的肠道菌群结构是否会一直稳固也是值得深入探讨的问题。如果这一假设得以确认,将会对现有的大菱鲆健康养殖工艺和疾病临床防控技术产生积极的影响。

参考文献:

- [1] Pérez T, Balcázar J L, Ruiz-Zarzuela I, et al. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem[J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(4): 355-360.
- [2] Ganguly S, Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism [J]. *Rev Fish Biol Fish*, 2012, 22(1): 11-16.
- [3] Gómez G D, Balcázar J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J]. *FEMS Immunol. Med Microbiol*, 2008, 52(2): 145-154.
- [4] Picchietti S, Fausto A M, Randelli E, et al. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 368-376.

- [5] Silphaduang U, Colorni A, Noga E J. Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish[J]. Dis Aquat Organ, 2006, 72: 241–252.
- [6] Mamoru Y, Takahisa K, Minoru S. Studies on the intestinal microflora of salmonids-I. The intestinal microflora of fish reared in fresh water and sea water[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1976, 42(1): 91–99.[吉水守, 木村乔久, 坂井捻. サケ科鱼类の肠内細菌叢に関する研究- . 饲养鱼的肠内細菌叢[J]. 日本水产学会志, 1976, 42(1): 91–99.]
- [7] Hiroshi S, Masao K. Bacterial flora in the digestive tract of marine fish-I. Bacterial flora of fish, red sea bream snapper and crimson sea bream, fed three kinds of diets[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1972, 38(1): 50–55.[瀬良洋, 木誤正夫. 海产鱼消化管の細菌- . マタイチタイの細菌相におよぼす餌料成分の影響[J]. 日本水产学会志, 1972, 38(1): 50–55.]
- [8] Sera H, Ishida Y, Kadota H. Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish- . Effect of H^+ concentration and gastric juices on the indigenous bacteria[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1972, 38(6): 859–863.
- [9] Yang G, Bao B, Peatman E, et al. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish Takifugu obscurus[J]. Aquaculture, 2007, 262(2): 183–191.
- [10] Sugita H, Enomoto A, Deguchi Y. Intestinal microflora in the fry of *Tilapia mossambica*[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1982, 48: 875.
- [11] Tanaasomwang V, Maroga K. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larve and juvenile stages[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1989, 55(8): 1371–1377.
- [12] O'Hara A M, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ [J]. EMBO Rep, 2006, 7(7): 688–693.
- [13] Pamer E G. Immune responses to commensal and environmental microbes[J]. Nat Immunol, 2007, 8(11): 1173–1178.
- [14] Mamoru Y, Takahisa K, Minoru S. Microflora of the embryo and the fry of salmonids[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1980, 46(8): 967–975.[吉水守, 木村乔久, 坂井捻. サケ科の鱼类稚仔鱼期にずける肠内細菌叢の形成时期について[J]. 日本水产学会志, 1980, 46(8): 967–975.]
- [15] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture [J]. Aquaculture, 2001, 200(1): 223–247.
- [16] Sun Y Z, Yang H L. A Review: Distribution and manipulation of fish gut microflora[J]. Fisheries science, 2008, 27(5): 257–261.[孙云章, 杨红玲. 浅谈鱼类消化道微生物的分布及调控[J]. 水产科学, 2008, 27(5): 257–261.]
- [17] Bairagi A, Ghosh K S, Sen S K, et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts[J]. Aquacult Int, 2002, 10(2): 109–121.
- [18] Zhu X Y, Tang F S. Distribution of *Aeromonas hydrophila* and its exoenzymes in the bacteria isolated from health cultured fish intestines[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 1994, 14(1): 35–39.[朱晓燕, 汤伏生. 健康家鱼肠道细菌中的嗜水气单胞菌及其胞外酶分布[J]. 湖北农学院学报, 1994, 14(1): 35–39.]
- [19] Ganguly S, Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism[J]. Rev Fish Biol Fish, 2012, 22(1): 11–16.
- [20] Bates J M, Akerlund J, Mittge, E, et al. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota [J]. Cell Host Microb, 2007, 2(6): 371–382.
- [21] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(8): 827–839.
- [22] Munro P D, Barbour A, Birkbeck T H. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(12): 4425–4428.
- [23] Munro P D, Barbour A, Birkbeck T H. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions[J]. J Appl Microbiol, 1994, 77(5): 560–566.
- [24] Blanch A R, Alsina M, Simon M, et al. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae[J]. J Appl Microbiol, 1997, 82(6): 729–734.
- [25] Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, et al. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(6): 731–739.
- [26] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. Vet Microbiol, 2006, 114(3–4): 173–186.
- [27] Zhang Y, Li Q F, Wang Y G, et al. Research status and application of probiotics to mariculture[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(6): 83–87.[张艳, 李秋芬, 王印庚, 等. 益生菌的研究现状及其在海水养殖中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 83–87.]
- [28] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. FEMS Immunol. Med. Microbiol, 2007, 51(1): 185–193.
- [29] Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, et al. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31(4): 372–382.

Factors that influence intestinal microflora formation in larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

SHI Xiuqing^{1,2}, WANG Yingeng², ZHANG Zheng², LIAO Meijie², LI Bin², ZHANG Shuzhi³, LI Hua¹

1. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Qingdao Zhongren Pharmaceutical Co., Ltd, Qingdao 266329, China

Abstract: Turbot (*Scophthalmus maximus*) is a cold-water marine fish. In recent years, with the expansion and improvement of turbot farming, bacterial disease has severely affected turbot development, especially in larvae. Because the fish have the special requirements for the living environment, disease occurrence is the result of interactions among fish, pathogens, and the environment. The gastrointestinal flora plays an important role in fish growth and development, and is closely related to disease occurrence. Therefore, it is necessary to investigate the gastrointestinal flora of larval fish. In this study, factors that influence gastrointestinal microflora formation and succession in turbot larvae were investigated by high-throughput sequencing. The intestinal tract microflora and their relationships with different development stages (e.g., larvae and fertilized eggs), chlorella, rotifer, artemia, pellet feed, and tank inlet water were analyzed. The results revealed that the intestinal tract microflora of turbot larvae was stable after initial feeding and was directly affected by bacteria in fertilized eggs. Meanwhile, microflora structure was stable during turbot larval development and barely influenced by the bacteria in water and feed. The dominant bacterium was *Lactococcus piscium* at a relative proportion of up to 45%–65% in larval intestines. In addition, the relative abundance of this bacterium in fertilized eggs reached 10.4%. Basing on these results, we suggest that the gastrointestinal tract of turbot larvae may be selective for the colonized bacteria. Some bacteria in water and feed, such as the *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Carnobacterium* sp., can colonize intestines as subdominant strains.

Key words: *Scophthalmus maximus* L.; larva breeding; intestinal tract microflora; influence factor; high-through sequencing technique

Corresponding author: ZHANG Zheng. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn