

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16386

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

王贤丰, 赵艳飞, 宋志飞, 钟声平, 黄国强, 童潼, 聂振平, 苏琼, 杨家林

广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西 北海 536000

摘要: 采用基于 Illumina HiSeq 测序平台的高通量测序技术, 对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)肠道及其养殖池塘水体、底泥中细菌种类及丰度进行了研究。测序结果显示, 3 个样品共获得有效序列 234575 条, 可聚类于 2812 个分类操作单元(OTUs), 归属于拟穴青蟹肠道、养殖水体、池塘底泥样品的操作分类单元(OTU)个数分别为 453、706 和 2547, 其中有 184 个 OTU 均能在 3 个样品中检测到, 在青蟹肠道和养殖水体、青蟹肠道和池塘底泥中分别检测到 197 和 309 个共有 OTU。物种注释结果显示, 拟穴青蟹肠道中优势细菌种类为变形菌门(Proteobacteria) (39.96%)、柔膜菌门(Tenericutes) (23.09%)和厚壁菌门(Firmicutes) (16.58%); 养殖水体中优势细菌种类为变形菌门(63.02%)、放线菌门(Actinobacteria) (24.96%)和拟杆菌门(Bacteroidetes) (8.41%); 池塘底泥中优势细菌种类为变形菌门(75.23%)、拟杆菌门(5.72%)和放线菌门(3.83%)。此外, 对各样品中丰度最高的前 10 位 OTU 分析显示, 不同样品中占优势地位的 10 种细菌在数据库(SILVA)缺乏相关已知序列, 并且各样品中的优势细菌种类完全不同。实验结果表明拟穴青蟹肠道与其他池塘养殖环境中菌群结构存在着密切的相关性, 但肠道菌群同时具有一定的独立性, 其优势细菌种类与养殖环境中优势细菌种类无关。本研究旨在为拟穴青蟹健康养殖和微生态调控提供实验依据。

关键词: 拟穴青蟹; 肠道; 养殖水体; 底泥; 菌群结构; 高通量测序; 微生态调控

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1245-09

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹, 是一种经济价值很高的海水养殖蟹类, 广泛分布于热带和亚热带, 是中国长江口以南沿海各省份主要海水养殖对象之一^[1]。随着苗种培育技术的突破和养殖技术的改进, 青蟹养殖规模和养殖产量逐年提高, 已成为中国产量最高的海水养殖蟹类^[2]。然而, 青蟹养殖过程中病害发生的频率呈逐年上升趋势, 特别是甲壳溃疡病^[3]、黄体病^[4]、颤抖病^[5]等细菌性疾病的暴发给养殖户造成了巨大的经济损失, 同时也严重制约了青蟹养殖产业的进一步发展。

为了更加有效地改善养殖生态环境、提高养殖生物的抗病力并且提升养殖水产品品质, 在水产养殖生产过程中开发和使用微生态制剂(probiotic products)受到了越来越多的关注^[6], 芽孢杆菌和乳酸菌制剂等微生态制剂已广泛应用于凡纳

滨对虾^[7]及其他甲壳动物^[8]的养殖生产。微生态制剂主要通过调节和优化养殖生物肠道和养殖环境中的微生物群落结构而发挥作用, 因此, 开展拟穴青蟹肠道及其养殖环境中正常菌群结构研究具有重要的应用潜力, 将为青蟹健康养殖和疾病防控提供科学依据。

近年来, 随着分子测序技术的发展, 基于 16S rDNA 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^[9-10], 其最大的优势是能全面解析微生物群落中细菌种类和数量^[11], 在凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)^[12-13]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[14]、刺参^[15]、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)^[16]等水生动物肠道及其养殖环境微生物群落结构研究中得到了广泛应用。目前, 有关拟穴青蟹养殖环境中微生物群落组成的研究已有报道, 如蔡丽萍等^[17]、冯振飞等^[4]和黄

收稿日期: 2016-12-28; 修订日期: 2017-02-09.

基金项目: 广西科技开发项目(桂科合 1599005-2-18; 桂科能 1598020-10; 桂科 AB16380105; 桂科合 14125008-2-20).

作者简介: 王贤丰(1989-), 男, 实习研究员, 硕士, 主要研究方向为拟穴青蟹健康养殖与遗传育种. E-mail: wang_xfeng@qq.com

通信作者: 杨家林(1963-), 女, 副研究员. E-mail: gxyangjialin@126.com

诗婷等^[18]分别对青蟹肠道及养殖环境中菌群多样性进行了研究,但其研究方法均以 DGGE 技术等传统方法为主,仅能分析样品中少数优势细菌而无法鉴定丰度微小的种类,难以全面深入地解析青蟹养殖环境细菌群落结构。

广西北海是拟穴青蟹的传统养殖区,本实验采用基于 Illumina HiSeq 测序平台的高通量测序技术对北海竹林村池塘养殖青蟹肠道、养殖水体和池塘底泥中细菌群落结构进行了研究,并分析了样品间的相关性,以期更深入地了解广西北海池塘养殖拟穴青蟹肠道及其养殖环境菌群结构,为拟穴青蟹健康养殖和微生态调控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集于广西北海竹林青蟹养殖区,采样池塘养殖面积 2 hm²,平均水深 0.5 m,泥沙底(泥:沙比例 85:15),于 2016 年 6 月 18 日放养 3 万只 I 期幼蟹,养殖过程每天投喂 1 次冰鲜杂鱼,仅在涨潮期间适量换水。本次实验取样时间为 2016 年 9 月 28 日,取样样品包括拟穴青蟹、池塘底泥及养殖水体。取样方法为用地笼从池塘对角线两侧区域随机采集 5 尾大小相近青蟹[体重(160±18) g],同时,分别用有机玻璃采水器和柱状采泥器在池塘对角线两侧离岸 1.5 m 及正中间位置采集水样(距水面 0.3 m)和底泥样品(水底表层 5 cm),将采集的水样及底泥分别放置于无菌采水瓶及无菌采样袋中。所采集的样品于冰盒中运送至实验室,并将采集的 3 个水样和底泥样品分别等量混合成 1 个送检样品。

1.2 水质测定

在采样时用多功能水质检测仪(YSI-6600)测定养殖池塘水温、pH、溶氧、盐度等常规水质指标,按照海洋检测规范^[19]分别采用靛酚蓝分光光度法、萘乙二胺分光光度法检测水体 TAN、NO²-N 浓度,用联合硝化法^[20]检测水体 TN、TP 浓度,用杭州陆恒生物科技有限公司检测试剂盒检测水体硫化物浓度。

1.3 样品总 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

用无菌冰水混合物对样本青蟹冷冻 15 min,

将休克的青蟹置于解剖盘用酒精进行体表消毒,在无菌环境中解剖取其肠道并用无菌海水冲洗 3 次后放置于灭菌的离心管,将 5 只青蟹的肠道混合成一个样本。用组织匀浆机分别对青蟹肠道样品及青蟹养殖池塘底泥样品匀浆后,再用 OMEGA 公司的 Soil DNA Kit 试剂盒提取肠道及底泥细菌总 DNA。将 1 L 水样先经 5 μm 孔径的混合纤维膜预过滤去除杂质后用 0.22 μm 无菌聚醚砜膜(津腾,中国)进行过滤,剪碎滤膜,再用 OMEGA 公司的 Water DNA Kit 试剂盒提取青蟹养殖池塘水样细菌总 DNA。对 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增,所用引物序列为: 341F (5'-CCTAYG-GGRBGCASCAG-3')和 806R(5'-GGACTACNNG-GGTATCTAAT-3')。送诺禾致源生物信息公司(北京)进行基于 Illumina HiSeq 测序平台的高通量测序。

1.4 数据分析

根据引物上 Barcode 序列从下机数据中拆分出各样品测序数据,利用 FLASH Version 1.2.7 软件对数据进行过滤、拼接,并利用 Qiime Version 1.7.0 软件与数据库(Gold database)比对(UCHIME Algorithm)检测并去除嵌合体序列。之后利用 Uparse Version 7.0.1001 软件对样品有效序列进行聚类,默认将具有 97%的一致性的序列聚类成为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),并用 Mothur 方法将 Uparse 构建 OTU 时选取的代表序列与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库进行比对分析,获得每个 OTU 的物种注释,每个 OTU 在结果分析中视作一种细菌。为了去除样品序列差异引起的误差,对所有样品进行均一化处理(以数据量最少的样品为标准, cutoff=69713),以处理后的数据为基础进行后续多样性分析。

2 结果与分析

2.1 养殖池塘水质情况

在本实验中采样池塘的水质指标见表 1,结果显示各水质指标都在正常范围内,这可能与养殖密度较低(15000 ind/hm²)、定期换水有关。

2.2 高通量测序结果

3 个样品所测得原始序列共 266496 条,经过

表 1 拟穴青蟹采样池塘水质指标
Tab. 1 Water quality indexes of sampled pond of *Scylla paramamosain*

养殖种类 aquaculture species	水温/℃ temperature of water	pH	盐度 salinity	DO	氨氮/(mg·L ⁻¹) nitrogen ammonia	亚硝酸氮 /(mg·L ⁻¹) nitrate	总氮/(mg·L ⁻¹) total nitrogen	总磷/(mg·L ⁻¹) total phospho- rus	硫化物 /(mg·L ⁻¹) sulphide
拟穴青蟹 <i>Scylla pa- ramamosain</i>	29.7±0.1	8.25±0.08	26.5±0	6.22±0.16	0.095±0.01	0.021±0.004	1.450±0.042	0.214±0.008	0.064±0.004

滤低质量和短长度序列、去除嵌合体序列后共获得 234575 条有效序列(表 2), 并聚类于 2812 个 OTU, 其中 174 个 OTU (1305 条序列)属于古细菌、26 个 OTU(125 条序列)属于未知序列。青蟹肠道、养殖水体和池塘底泥样品中 OTU 数目分别为 453、706 和 2547 个, 其中 3 个样品共有 OTU 个数为 184, 特有 OTU 个数分别为 131、121 和 1850 (图 1)。

表 2 拟穴青蟹池塘各样品高通量测序结果分析
Tab. 2 Analysis of the high-through sequencing results

样品组别 sample	原始序列 raw tag	有效序列 effective tag	有效 OTU effective OTU	测序深度 goods coverage
青蟹肠道 intestine	80578	70136	453	0.998
养殖池水 pond water	85785	76676	706	0.997
池塘底泥 pond sediment	100133	87763	2547	0.997

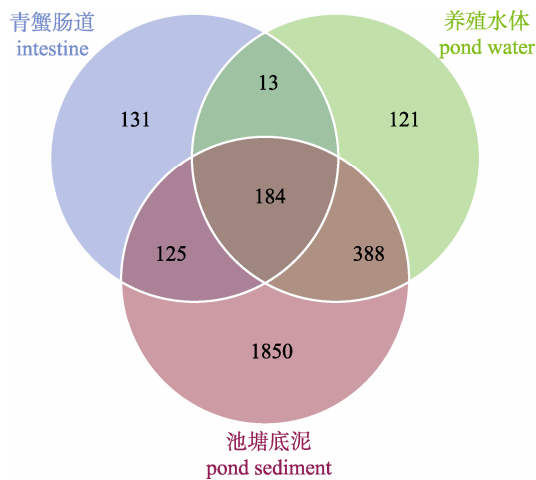


图 1 拟穴青蟹养殖池塘各样品中细菌数目的 veen 分析
图中数字为样本 OTU 数量。
Fig. 1 Veen analysis in different samples
The number in figure indicates the OTUs in different samples.

用 Mothur 软件对所得到的有效 OTU 进行 rarefaction 分析, 利用 R 语言工具制作稀释性曲线(图 2)。由图 2 可知, 随着测序序列的增加各样品所能观测到的 OTU 数目增加缓慢, 稀释性曲线均逐渐趋于平缓, 各样品测序深度均在 99%以上, 说明本次测序较好地覆盖了菌群的多样性。

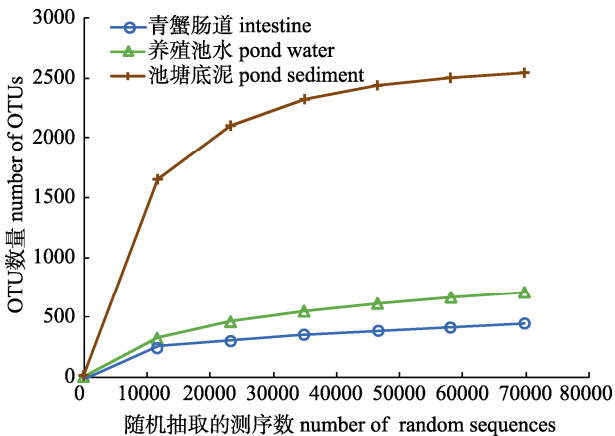


图 2 拟穴青蟹养殖池塘各样品高通量测序结果的稀释性曲线

Fig. 2 The rarefaction curve of high-through sequencing result

2.3 菌群多样性分析

使用 Qiime 软件对各样品均一化处理后的数据进行多样性分析, 计算 Chao1、ACE、Shannon 指数(表 3)。结果显示, 青蟹肠道、养殖池水、池塘底泥样品中多样性指数依次增大, 说明在拟穴青蟹池塘养殖系统中泥底中菌群丰富度及多样性最高, 青蟹肠道菌群丰富度及多样性最低。

2.4 各样品细菌群落组成

根据物种注释结果, 3 个样品在本次检测中所属细菌归属于 48 个门、80 个纲、152 个目、227 个科、259 个属, 各样品在不同分类水平上菌群组成存在较大的差异(表 4), 池塘底泥样品在各分类

表 3 拟穴青蟹养殖池塘各样品的 α -多样性指数

Tab. 3 α -diversity indexes of each sample			
样品组别 sample	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	Shannon 指数 Shannon index
青蟹肠道 intestine	742.800	691.385	3.915
养殖池水 pond water	859.854	900.524	4.460
池塘底泥 pond sediment	2606.719	2612.062	8.777

表 4 拟穴青蟹养殖池塘各样品菌群基本构成

Tab. 4 Composition of bacterial communities in different samples						
样品组别 sample	门 hylum	纲 class	目 order	科 family	属 genus	分类单元 OTU
青蟹肠道 intestine	27	44	82	121	128	453
养殖池水 pond water	34	54	101	139	139	706
池塘底泥 pond sediment	46	78	145	202	206	2547

水平上所包含的种类最多, 养殖池水样品较少, 青蟹肠道样品最少。

在门分类水平上, 3 个样品中主要门类为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、柔膜菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)等, 不同种类细菌在各样品中丰度存在较大差异(图 3), 另外 13 个门类的细菌在 3 个样品中的检测量均不足 1%, 主要为脱铁杆菌门(Deferribacteres)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、TA06、绿菌门(Chlorobi)、黏胶球菌门(Latescibacteria)、TM6、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Gracilibacteria、Acetothermia、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、LCP-89、迷踪菌门(Elusimicrobia)和 Marinimicrobia_SAR406_clade。青蟹肠道样品中含有 27 个门类的细菌, 占比前 3 位的细菌门分别是变形菌门(39.96%)、柔膜菌门(23.09%)和厚壁菌门(16.58%), 包含一个特有种类 Hyd24-12; 养殖水体样品中含有 34 个细菌门类, 占比前三位的细菌门分别是变形菌门(63.02%)、放线菌门(24.96%)和拟杆菌门(8.41%), 包含一个特有种类 Candidate_division_OP3; 池塘底泥样品中含有 46 个门类的细菌, 占比前 3 位的细菌门

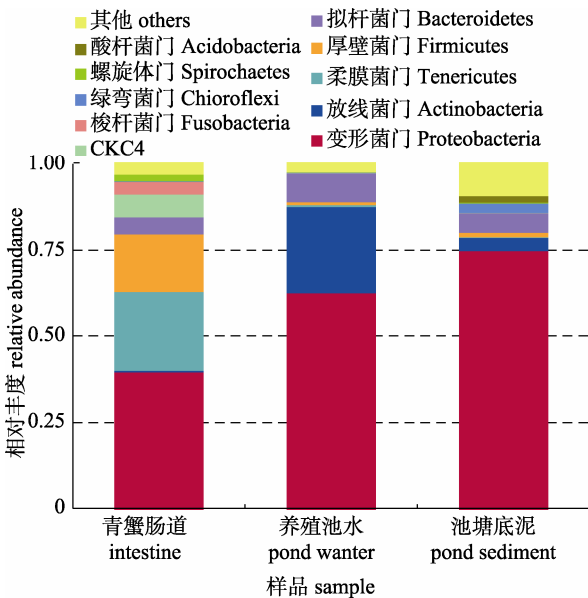


图 3 拟穴青蟹养殖池塘样品中基于门水平的菌群相对丰度分析

Fig. 3 Relative abundance of phylum-level bacterial communities in different samples in pond

分别是变形菌门(75.23%)、拟杆菌门(5.72%)和放线菌门(3.83%), 包含了微热菌门(Thermomicrobia)等 12 个特有种类。由此表明, 变形菌门是 3 个样品的最主要优势菌, 检测到的范围为 39.96%~75.23%, 但其他优势菌门在各样品间有所差异。养殖水体和池塘底泥中优势菌种类相同, 但不同种类细菌丰度有所差异, 而青蟹肠道样品与环境样品的菌群组成有较大差异, 柔膜菌门和厚壁菌门是肠道样品的主要细菌, 在水体及底泥样品中占比却很小(分别为 0.52%、0.13%和 0.83%、1.29%), 同时, 放线菌门在养殖水体和底泥样品中占比较大, 在青蟹肠道样品中却很少(0.40%)。

为了进一步了解样品菌群结构, 选取各样品中丰度最高的前 10 位 OTU 进行列表分析(表 5)。结果发现, 3 个样品中所含菌群丰度最高的 10 个 OTU 的序列经 SILVA 数据库比对发现主要与变形菌门、放线菌门、柔膜菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、CKC4 及螺旋体门 7 个门类细菌类似。其中, 青蟹肠道样品均包含了这些门类细菌, 占比前 3 位的细菌分别是变形菌门的美人鱼发光杆菌(Photobacterium_damselae, 24.84%)、柔膜菌门支原体科(Mycoplasmataceae)的一种未知细菌(22.44%)

表 5 拟穴青蟹养殖池塘各样品中细菌丰度最高的 10 个 OTU
Tab. 5 Ten most abundant bacterial OTUs in different samples in the ponds, listed from the most to least abundance

OTU 编号 OTU code			物种注释结果 classification result	OTU 编号 OTU code			物种注释结果 classification result
肠道 intestine	OTU_2	24.84	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	OTU_3	21.10	alpha 变形菌 <i>Alpha proteobacterium HIMB114</i>	水体 pond water
	OTU_1	22.44	支原体科 <i>Mycoplasmataceae</i>	OTU_4	19.98	<i>Candidatus aquiluna</i>	
	OTU_5	12.51	<i>Proteocatella</i>	OTU_9	7.26	噬菌弧菌科 <i>Bacteriovoracaceae</i>	
	OTU_6	6.55	CKC4	OTU_7	6.09	吞菌弧菌属 <i>Peredibacter</i>	
	OTU_10	4.47	羧酸杆菌属 <i>Carboxylicivirga</i>	OTU_8	5.58	alpha 变形菌 <i>Alpha proteobacterium HIMB59</i>	
	OTU_15	3.05	<i>Clostridia bacterium</i>	OTU_13	4.71	<i>Litoricola</i>	
	OTU_17	2.91	弧菌属 <i>Vibrio</i>	OTU_12	3.41	<i>Candidatus pelagibacter</i>	
	OTU_16	2.80	盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	OTU_44	2.72	<i>Candidatus Actinomarina</i>	
	OTU_14	2.51	弓形杆菌属 <i>Arcobacter</i>	OTU_22	2.42	<i>Balneola</i>	
	OTU_19	1.95	螺旋菌属 <i>Spirochaeta</i> 2	OTU_30	2.11	NS5 marine group	
OTU 编号 OTU code			物种注释结果 classification result	OTU 编号 OTU code			物种注释结果 classification result
底泥 pond sediment	OTU_11	4.11	黄色深海单胞菌科 JTB255 marine benthic group	OTU_50	1.66	<i>Desulfobacteraceae</i>	底泥 pond sediment
	OTU_29	3.43	(底泥)脱硫杆菌属 <i>Sva0081</i> sediment group	OTU_32	1.54	gamma 变形菌 gamma proteobacteria	
	OTU_57	2.47	Cellvibrionales 目 BD2-7	OTU_24	1.51	互营杆菌科 <i>Syntropho bacteraceae</i>	
	OTU_26	2.46	(底泥)脱硫杆菌属 <i>Sva0081</i> sediment group	OTU_68	1.50	(底泥)脱硫杆菌属 <i>Sva0081</i> sediment group	
	OTU_20	1.70	Cellvibrionales 目 BD2-7	OTU_36	1.46	黄色深海单胞菌科 JTB255 marine benthic group	

和厚壁菌门 *Proteocatella* 属的一种未知细菌 (12.51%); 养殖水体样品包含了变形菌门、放线菌门和拟杆菌门, 占比前 3 位的细菌分别是变形菌门 *Alpha proteobacterium HIMB114*(21.10%)、放线菌门 *Candidatus aquiluna* 属的一种未知菌类和变形菌门 *Bacteriovoracaceae* 科的一种未知细菌; 而池塘底泥样品全部为变形菌门细菌, 主要包括 γ -变形菌和 δ -变形菌, 但各种类细菌相对丰度均很小(1.46%~4.16%)。值得注意的是, 虽然 3 个样品中优势度最高的前 10 种细菌在门分类水平上相差不大, 但是各样品占优势地位的 10 种细菌却完全不相同。同时, 本研究样品中所检测到的优势细菌绝大部分在 SILVA 数据库中没有种水平的参考序列, 只有青蟹肠道和养殖水体样品中的各 2

种细菌有相关已知序列。

3 讨论

细菌群落在养殖环境物质循环及能量流动中发挥着重要作用, 同时对养殖生物肠道微生物结构也有重要影响^[21]。对养殖环境中菌群多样性研究, 不仅可以为养殖过程中病害防治提供基础, 还可以为养殖环境微生态调控技术构建提供理论支撑。本研究利用高通量测序技术分析了广西北海地区池塘养殖拟穴青蟹肠道及养殖环境菌群结构, 共检测到 234575 条有效序列, 并聚类于 2812 个分类操作单元, 进一步分析表明样品中除以往报道过的拟穴青蟹养殖环境中的变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门、柔膜菌门、梭杆菌

门、蓝细菌门、异常球菌-栖热菌门、浮霉菌门及绿弯菌门^[18, 22]外, 还检测到古细菌、酸杆菌门、黏胶球菌门、脱铁杆菌门、硝化螺旋菌门、黏胶球菌门、纤维杆菌门、迷踪菌门等 38 个丰度较小的细菌门类, 说明基于 Illumina HiSeq 测序平台的高通量测序技术能较全面的了解拟穴青蟹养殖环境中菌群组成及丰度。水质检测结果显示采样池塘各水质指标均在正常范围内, 因此, 本研究结果能在一定程度上反映广西北海竹林拟穴青蟹养殖区正常养殖情况下池塘养殖拟穴青蟹肠道及其养殖环境中的菌群结构, 增加了拟穴青蟹池塘养殖菌群的研究内容。

通过分析样品多样性指数可知, 拟穴青蟹池塘养殖环境中青蟹肠道、养殖水体、池塘底泥中的菌群丰度及多样性逐个升高, 实验结果与刺参^[15]、半滑舌鳎^[23]、凡纳滨对虾^[12]等水产生物消化道及其池塘养殖环境中菌群多样性结果一致, 即养殖环境中菌群多样性比养殖生物肠道菌群多样性高。物种注释结果显示, 变形菌门细菌是各样品的优势菌, 主要包括 α -变形菌、 γ -变形菌门和 δ -变形菌, 放线菌门和拟杆菌门细菌是养殖水体和池塘底泥中的次优势菌。李杰等^[24]在研究 C/N 比水平对虾蟹混养系统中水体细菌群落结构的影响时发现, 变形菌门及放线菌门细菌是养殖水体中优势种类。陈琛等^[13]在研究凡纳滨对虾高位池不同密度养殖水体细菌群落动态时发现变形菌门、放线菌门和拟杆菌门细菌是养殖水体中丰度最高的细菌种类。柔膜菌门和厚壁菌门细菌是拟穴青蟹肠道中的次优势菌, 在肠道细菌组成中比例分别为 23.09%和 16.58%, 这一结果与其他甲壳类养殖生物肠道菌群研究结果存在较大差异。例如, 王春忠等^[25]在研究长毛对虾肠道微生物群落结构时发现变形菌和厚壁菌门细菌是肠道中的优势细菌种类, 而柔膜菌门细菌占比较少; 孙振丽等^[12]及 Tang 等^[26]应用高通量技术分析凡纳滨对虾肠道细菌种群, 结果表明变形菌门、厚壁菌门、放线菌门是其优势种类; 狄盼盼等^[27]等研究发现, 养殖中华绒螯蟹肠道优势种类为变形菌门和拟杆菌门细菌。由此表明, 拟穴青蟹养殖环境与其他水产生物养殖环境中菌群结构类似, 但

其肠道与其他养殖生物肠道优势细菌组成不同, 柔膜菌门细菌仅在拟穴青蟹肠道菌群中占据优势地位而在其他养殖生物肠道菌群中比例较少, 这种差异一方面可能与拟穴青蟹肠道环境特殊性有关, 另一方面可能与拟穴青蟹养殖中主要投喂冰鲜野杂鱼而在其他水产动物养殖中主要投喂配合饲料有关。

Li 等^[22]应用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)指纹图谱分析技术对汕头地区拟穴青蟹野生与养殖群体肠道细菌多样性进行了研究, 结果表明野生个体和养殖健康个体的肠道菌群结构类似, 其优势种类为柔膜菌门、变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、未分类细菌门和梭杆菌门。本研究结果显示, 变形菌门(39.96%)、柔膜菌门(23.09%)、厚壁菌门(16.58%)、CKC4(6.5%)、拟杆菌门(4.96%)和梭杆菌门(3.68%)是池塘养殖拟穴青蟹肠道菌群中的优势种类, 由此表明两者拟穴青蟹肠道菌群结构类似, 但其优势种类中还存在一些未分类细菌, 还需进一步研究。

有学者研究发现, 许多甲壳动物的肠道菌群结构常随着养殖水环境中的菌群结构而变化, 虾类肠道的细菌群落结构很大程度上受养殖环境微生物的影响^[22, 28], 细菌群落遵循从水体到虾肠道内的演替规律^[29], 也有研究表明水体及底质中的细菌群落会对鱼类消化道中的菌群结构产生影响^[14]。然而, 张正等^[23]研究发现池塘养殖半滑舌鳎消化道菌群多样性及菌群组成结构与养殖水体中的细菌明显不同, 两者之间不存在相关性; 王春忠等^[25]在研究长毛对虾肠道及其养殖环境微生物群落结构时发现, 长毛对虾肠道与其养殖环境细菌群落相似性较低, 微生物种群结构存在巨大差异; Chaiyapechara 等^[30]研究认为, 养殖环境对肠道微生物组成贡献不大, 肠道微生态结构具有相对独立性。在本研究中, 26 个门、40 个纲、71 个目、97 个科的细菌种类在拟穴青蟹肠道、养殖水体及池塘底泥样品中均能检测到, 同时拟穴青蟹肠道菌群中分别有 197 个、309 个 OTU 能在养殖水体和池塘底泥中检测到, 分别占肠道总 OTU 数的 43.49%和 68.21%, 表明拟穴青蟹肠道菌群组成与养殖环境中的菌群组成密切相关。对

实验结果进一步分析表明,虽然青蟹肠道与养殖环境中有许多相同的OTU序列,但肠道样品中丰度前10位优势细菌种类与养殖环境中前10位优势细菌种类完全不同。由此推测,池塘养殖拟穴青蟹肠道菌群结构与其养殖环境菌群结构密切相关,但肠道菌群具有一定的独立性,其优势细菌种类几乎不受养殖环境菌群的影响。

已有研究结果显示,养殖环境中芽孢杆菌、乳酸菌及光合细菌等益生菌在抑制病原微生物及维持养殖环境微生态平衡等方面具有重要作用,在养殖过程中使用益生菌制剂不仅可以提高养殖生物的机体免疫力减少养殖病害发生,也能有效提高饲料利用率、促进养殖生物快速生长^[6-8]。在本研究中,健康拟穴青蟹肠道及其养殖环境中芽孢杆菌等常见益生菌丰度很小,而美人鱼发光杆菌及弧菌等海水养殖常见的致病菌在青蟹肠道菌群中的丰度较高,虽然取样池塘没有暴发疾病,但为了拟穴青蟹健康生长,在养殖后期应加强管理注意细菌性疾病的暴发。此外,本次高通量测序发现,池塘养殖中健康青蟹肠道中益生菌缺乏而条件致病菌丰度较高,这可能是拟穴青蟹养殖过程中病害频发的原因之一,同时这也表明了拟穴青蟹池塘养殖中使用益生菌的重要性。

参考文献:

- [1] Wang G Z, Li S J, Chen Z G. Status of mud crabs (*Scylla* spp.) farming and studies on the population biology of *S. paramamosain*[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2016, 55(5): 617-623. [王桂忠, 李少菁, 陈志刚. 青蟹(*Scylla* spp.)养殖现状及拟穴青蟹(*S. paramamosain*)种群生物学研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2016, 55(5): 17-623.]
- [2] The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China Fishery Statistics Yearbook 2016[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 28-33. [中华人民共和国农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 2016[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 28-33.]
- [3] Yano Y, Kaneniwa M, Satomi M, et al. Occurrence and density of vibrio parahaemolyticus in live edible crustaceans from markets in China[J]. J Food Prot, 2006, 69(11): 2742-2746.
- [4] Feng Z F, Wang G L, Qian D, et al. Microbial flora and quantitative distribution of bacteria in culture ponds of mud crab *Scylla serrata*[J]. Fisheries Science, 2008, 27(11): 574-577. [冯振飞, 王国良, 钱冬, 等. 锯缘青蟹养殖环境中细菌类群及其数量分布[J]. 水产科学, 2008, 27(11): 574-577.]
- [5] Zhen T L. A review of research progresses of diseases in mud crab *Scylla Paramamosain*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(5): 326-330. [郑天伦. 拟穴青蟹病害研究进展[J]. 水产科学, 2014, 33(5): 326-330.]
- [6] Chen Q, Zhang X X, Zhao H, et al. Advance in research and application of microbial ecological agent in aquaculture[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(3): 524-530. [陈谦, 张新雄, 赵海, 等. 用于水产养殖的微生态制剂的研究和应用进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 524-530.]
- [7] Wang Y B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2007, 269(1): 259-264.
- [8] Li J, Sun X T, Wang Q, et al. Studies on the effects of probiotics in crustacean's farming[J]. Marine Fisheries Research, 2001, 22(2): 26-31. [李健, 孙修涛, 王群, 等. 微生态制剂在甲壳动物养殖中的应用研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 26-31.]
- [9] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(S1): 4516-4522.
- [10] 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]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [11] Sun X, Gao Y, Yang Y F. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 393-400. [孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 393-400.]
- [12] Sun Z L, Xuan Y M, Zhang H, et al. Bacterial diversity in the *Penaeus vannamei* boone intestine and aquaculture environment[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 594-605. [孙振丽, 宣引明, 张皓, 等. 南美白对虾养殖环境及其肠道细菌多样性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 594-605.]
- [13] Chen C, Yan M C, Zhang X, et al. Dynamics of the bacterial community in rearing water from an intensive pond containing different stocking densities of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 985-993. [陈琛, 闫茂仓, 张翔, 等. 凡纳滨对虾不同养殖密度高位

- 池水体细菌群落动态[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 985–993.]
- [14] Li C Y, Xu Y J, Liu X Z, et al. Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 245–255. [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.]
- [15] Dou Y, Zhao X W, Ding J, et al. Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(1): 122–129. [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 122–129.]
- [16] Hou T T, Zhong Z P, Liu Y, et al. Bacterial community characterization of rearing water of marine recirculating aquaculture systems for yellow grouper (*Epinephelus awoara*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(2): 253–263. [侯婷婷, 钟志平, 刘纓, 等. 青石斑鱼海水循环水养殖水体的细菌群落特征[J]. 微生物学报, 2016, 56(2): 253–263.]
- [17] Cai L P, Xu H S, He L, et al. Analysis of the intestinal bacterial communities in wild *Scylla serrata* from different districts by PCR-DGGE[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2011, 23(2): 278–282. [蔡丽萍, 徐海圣, 何琳, 等. PCR-DGGE 技术分析不同地区野生锯缘青蟹肠道菌群多样性[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 278–282.]
- [18] Huang S T, Chen R Y, Liu K S, et al. Comparative study of aquatic bacterial community from 4 ponds farming mud crabs, *Scylla paramamosain*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2012, 31(3): 387–395. [黄诗婷, 陈荣元, 刘克韶, 等. 四个拟穴青蟹养殖池水环境中细菌群落结构的比较研究[J]. 台湾海峡, 2012, 31(3): 387–395.]
- [19] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB 17378.4-2007, People's Republic of China Marine Monitoring Code[S]. Beijing: China Standards Press, 2008: 109–115. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国标准化委员会. GB 17378.4-2007, 中华人民共和国海洋监测规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 109–115.]
- [20] Xing D L, Huo T B, Wu H M, et al. Simultaneous digestion for determination of total phosphorus and total nitrogen in sea water[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2006, 21(3): 219–225. [邢殿楼, 霍堂斌, 吴会民, 等. 总磷、总氮联合消化的测定方法[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 219–225.]
- [21] Li S, Sun L, Wu H, et al. The intestinal microbial diversity in mud crab (*Scylla paramamosain*) as determined by PCR-DGGE and clone library analysis[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(6): 1341–1351.
- [22] Wang F, Yang J F, Chen J G, et al. Comparison of the bacterial community structure in the crab seawater cultured and the outside environment by PCR-DGGE fingerprint technique: *Portunus trituberculatus* and *Scylla serrata*[J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(4): 59–64.
- [23] Zhang Z, Li B, Wang Y G, et al. The microflora structure in digestive tract of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) cultured in outdoor pond basing on high-through sequencing technique[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 38–45. [张正, 李彬, 王印庚, 等. 基于高通量测序的池塘养殖半滑舌鳎消化道菌群的结构特征分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 38–45.]
- [24] Li J, Tian X L, Dong S L, et al. Effect of molasses addition on microbial community structure in the polyculture system of *Portunus trituberculatus* and *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(5): 38–49. [李杰, 田相利, 董双林, 等. 添加糖蜜对虾蟹混养系统水体细菌群落结构的影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2016, 46(5): 38–49.]
- [25] Wang C Z, Lin G R, Yan T, et al. Microbial community in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestine and its culture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 706–712. [王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及虾肠道微生物群落结构研究[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 706–712.]
- [26] Tang Y, Tao P, Tan J, et al. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(8): 13663–13680.
- [27] Di P P, Chen X B, Sun G W, et al. Constitution analysis of intestinal dominant bacteria community in cultured Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Microbiology, 2014, 34(1): 58–61. [狄盼盼, 陈小兵, 孙国伟, 等. 养殖中华绒螯蟹肠道内优势细菌群落组成分析[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(1): 58–61.]
- [28] 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]. Aqu Res, 2010, 42(1): 47–56.
- [29] Shen H, Wan X H, He P M, et al. Bacterial community structure in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* holo-

huis[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1922–1928. [沈辉, 万夕和, 何培民, 等. 脊尾白虾肠道微生物菌群结构[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1922–1928.]

[30] Chaiyapechara S, Rungrasamee W, Suriyachay I, et al.

Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms[J]. Microb Ecol, 2012, 63(4): 938–953.

Application of high-throughput sequencing techniques for analyzing bacterial communities in pond-raised mud crab (*Scylla paramamosain*) intestine and its aquaculture environment

WANG Xianfeng, ZHAO Yanfei, SONG Zhifei, ZHONG Shengping, HUANG Guoqiang, TONG Tong, NIE Zhenping, SU Qiong, YANG Jialin

Key Laboratory of Marine Biotechnology; Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China

Abstract: Mud crab (*Scylla paramamosain*), widely cultured in brackish and seawater ponds along the coast of southern China, has become the most productive seawater crab species because of its strong adaptive abilities and high economic value. Bacteria play an important role in pond aquaculture ecosystems; however, little is known about the bacterial composition and diversity in earthen aquaculture pond microbial communities of *S. paramamosain*. Accordingly, we applied Illumina HiSeq high-throughput sequencing to investigate bacterial community structure and diversity in pond-raised *S. paramamosain* intestinal and its aquacultural environment. The results showed that 234575 effective sequences were detected in three samples, and they could be classified into 2812 operational taxonomic units (OTUs), among which 453, 706, and 2547 OTUs belong to the gut of *S. paramamosain*, the aquaculture water, and the sediment, respectively. 184 OTUs were shared among all samples, 197 OTUs between *S. paramamosain* intestine and aquaculture water, 309 OTUs between *S. paramamosain* intestine and sediment, and 572 OTUs between the aquaculture water and sediment. This indicates that bacterial richness and diversity were lower in *S. paramamosain* intestine than in water and sediment. In total, 48 phyla were identified, among them Proteobacteria (39.96%), Tenericutes (23.09%), Firmicutes (16.58%), CKC4 (6.55%), and Bacteroidetes (4.96%), which constituted the predominant components of the *S. paramamosain* intestine; Proteobacteria (63.02%), Actinobacteria (24.96%), Bacteroidetes (8.41%), Cyanobacteria (1.19%), and Firmicutes (0.83%) were the predominant phyla in the water; and the predominant phyla in the sediment were Proteobacteria (75.23%), Bacteroidetes (5.72%), Actinobacteria (3.83%), Chloroflex I (2.65%), and Acidobacteria (1.80%). Analysis of the 10 most abundant bacterial OTUs in different samples revealed that the most dominant bacteria in *S. paramamosain* intestine and its aquacultural environment were totally different, and there were only four kinds of dominant bacteria that have close sequences in the SILVA database. These results suggest that there exists a close correlation between bacterial species composition in the *S. paramamosain* intestine and its aquacultural environment. Meanwhile, intestinal microflora may be a relatively independent microbial ecosystem and the micro-ecosystem could hardly be influenced by the bacteria in the culture environment.

Key words: *Scylla paramamosain*; intestine; pond water; sediment; bacterial community; high-throughput sequencing; microalgae ecology control

Corresponding author: YANG Jialin. E-mail: gxyangjialin@126.com