

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18221

投喂鲍内脏多糖对罗非鱼肠道菌群结构的影响

吴振聪¹, 张莎莎¹, 杨转¹, 熊何健², 马英¹

1. 集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

摘要: 利用 PCR-DGGE 和 Illumina 测序技术研究了罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道菌群结构及饲喂鲍内脏多糖后罗非鱼肠道菌群的动态变化。在罗非鱼肠道中检测到 13 个门的细菌, 其中梭杆菌门(*Fusobacteria*, 77.84%)为优势菌门, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 8.59%)、衣原体门(*Chlamydiae*, 6.18%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 5.84%)和放线菌门(*Actinobacteria*, 1.20%)为次优势菌门, 还检测到 *Saccharibacteria* 等 8 个菌门和一些未知类群。在属的水平上, 优势菌属为鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、*Neochlamydia*、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*), 分别占 77.84%、5.796%、2.64%和 1.13%, 还有一个紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*)的未知属, 占 8.29%。此外还有分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等 6 个菌属和一些未知属。投喂添加鲍多糖的饲料对罗非鱼肠道微生物的构成造成了明显影响, 饲喂鲍多糖的处理组和饲喂普通饲料的对照组样品分别聚为两大类。投喂添加鲍多糖饲料后, 放线菌门、*Saccharibacteria*、疣微菌门和 TM6_Dependentiae 的丰度显著下调; 在属的水平上, 邻单胞菌属、鲸杆菌属的丰度上调; *Neochlamydia*、不动杆菌属、分枝杆菌属、*Alsobacter*、*Aquicella*、假单胞菌属、气单胞菌属、*Alpinimonas* 等属的丰度下调。其中分枝杆菌属、*Alsobacter*、*Aquicella* 和邻单胞菌属的丰度与对照差异显著($P < 0.05$)。在种水平上, 一些潜在致病菌, 如鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、*Aeromonas sharmana*、耐酪酸豕村菌(*Tsukamurella tyrosinosolvens*)、铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等的丰度下调, 其中龟分枝杆菌和耐酪酸豕村菌与对照差异显著($P < 0.05$), 而鲸杆菌属等有益菌的丰度上调。本研究从肠道微生物的角度来研究鲍内脏多糖对宿主的影响, 为海洋生物活性物质的功效评价提供了新思路, 也为鲍内脏活性物质的开发利用、益生元的研制等奠定理论基础。

关键词: 肠道菌群; 鲍内脏多糖; Illumina MiSeq 高通量测序; 罗非鱼

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0546-13

肠道菌群是一个复杂的微生态系统, 肠道菌群在正常情况下与宿主和外界环境都维持着相对平衡, 从而保持机体健康。影响肠道内菌群结构的相关因素有药物、饮食、益生菌、膳食补充剂、食品添加剂以及外部环境等。益生元是能够选择性地促进宿主肠道内有益细菌生长繁殖的非消化性化学物质。益生元通过选择性地增殖肠道土著有益菌, 阻止病原菌的定植, 促进病原菌的排除, 达到调整肠道菌群, 促进机体健康的目的。益生

元主要包括各种寡糖类物质和可能的非碳水化合物物质, 如低聚半乳糖、乳果糖、异麦芽寡糖等^[1-2]。研究发现, 甘露寡糖促进了奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)肠道乳酸杆菌有益菌的增殖, 抑制大肠杆菌的增殖^[3]。饲料中添加果寡糖对奥尼罗非鱼生长性能、饲料转化效率及肠道菌群也有一定改善作用^[4]。海洋生物体内多糖的合成过程较陆生动物有所不同, 容易产生很多特殊结构和作用的活性物质, 因此近年来人们对海洋生物

收稿日期: 2018-07-04; 修订日期: 2018-09-26.

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项(201405016); 福建省科技引导性项目(2016N0022).

作者简介: 吴振聪(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: 980285151@qq.com

通信作者: 马英, 女, 教授, 博士, 研究方向为水产生物技术. E-mail: maying@jmu.edu.cn

多糖的活性功能给予了极大关注。但海洋生物多糖的活性研究主要集中在藻类和微生物来源的多糖,而对海洋动物多糖的研究还不够深入,且对其活性评价主要集中在体外抗氧化活性和细胞水平的抗氧化研究,而对宿主肠道微生物的影响报道较少^[5-6]。鲍隶属软体动物门,腹足纲,原始腹足目,鲍科,鲍属,有很高的经济价值,居中国传统的四大海味之首^[7]。除了鲜食以外,鲍大多会被加工成鲍鱼罐头、干鲍和冷冻鲍3种产品,在加工这些产品时,大量鲍内脏被废弃,造成了极大的浪费,也因此对环境造成了污染。鲍内脏的营养成分及组成与鲍肌肉中的类似,都含有丰富的蛋白质、氨基酸、脂肪以及多种生物活性物质。如盘鲍内脏中含有包括人体必需的7种氨基酸在内的16种氨基酸^[8]。鲍内脏中富含的鲍多糖具有提高免疫力、抗肿瘤和抗氧化等生物活性^[9-12]。

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是中国重要的养殖鱼类,随着集约化养殖发展,抗生素等药物的滥用带来了耐药性和药残的问题。作为潜在的抗生素替代物,益生元是目前的研究热点之一^[1,4,13]。本研究以鲍内脏废弃物为原料,经过两次酶解得到鲍内脏多糖(abalone visceral crude polysaccharide, CAVP)。以罗非鱼为研究对象,分别饲喂不同剂量的CAVP。收集罗非鱼肠道样品,提取总DNA,PCR扩增16S rDNA片段。分别通过DGGE和高通量测序两种手段研究投喂CAVP后罗非鱼肠道微生物的变化。从肠道微生物的角度来评价CAVP对宿主的影响,为海洋生物活性物质的功能评价及开发利用提供参考。本研究在提升鲍内脏的附加值、促进废物利用和减少环境污染等方面也具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

罗非鱼购于厦门同安养殖场。

1.2 实验方法

1.2.1 CAVP 饲料的制备 CAVP的制备根据王姣等^[14]的优化条件进行。将购买的商业饲料粉碎,并过60目筛,然后添加不同剂量的CAVP水溶液,混合均匀后用挤压机制成直径2~2.5 mm颗粒饲料。

1.2.2 实验设计 选用体重为 (7.5 ± 0.15) g的健康罗非鱼120尾随机分为4组:阴性对照组T-CK、CAVP低(T-SL)、中(T-SM)和高剂量组(T-SH),4个组分别在饲料中添加0、500、1000、1500 mg/kg CAVP。每组30尾鱼,设3个重复,每个重复10尾。驯养1周后开始实验。养殖采用循环水系统,每天早晚各饲喂1次,每天换水约50%,每天的饲料投喂量为罗非鱼总体质量的2.5%。实验期间水温保持25.2~27℃。

1.2.3 生长指标的测定 实验周期共计30 d。测量罗非鱼的初始体重,实验开始后分别在15 d、30 d测量鱼的体重,计算鱼体相对增重率、特定生长率,其计算公式如下:相对增重率(relative weight gain rate, R_w)/% = 平均增重量/平均初重量 $\times 100$;特定生长率(specific growth rate, SGR)/% = $[\ln(\text{平均末重量}) - \ln(\text{平均初重量})]/\text{投食天数} \times 100$ 。

1.2.4 样品采集 分别在试验第15天和第30天采集肠道样品。每组随机取4条罗非鱼,每条鱼肠道为一个样品。每次停食24 h后采集样品。用75%的乙醇对鱼体消毒,打开腹腔,用乙醇擦拭肠道外部,无菌生理盐水冲洗2~3次,用剪刀剪下肠道放入无菌离心管中,待提取DNA。

1.2.5 DNA提取及PCR-DGGE 罗非鱼肠道样品总DNA提取按照天根粪便基因组DNA提取试剂盒的说明步骤进行。使用细菌16S rRNA基因通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')进行第一轮PCR扩增,扩增产物稀释10倍后作为模板,以带GC-clamp的引物GM5F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAGCAG-3')和518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行巢氏PCR扩增。总反应体系为50 μL : Ex Taq酶为25 μL , GM5F为1.5 μL (10 mmol/L), 518R为1.5 μL (10 mmol/L), 模板为1 μL , 去离子水加21 μL 。反应条件: 预变性94℃、5 min, 94℃、1 min, 60℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 进行25个循环; 72℃延伸10 min。扩增产物用于后续DGGE分析。

在变性剂梯度为40%~60%, 电压60 V, 温度60℃的条件下进行DGGE电泳14 h。电泳结束后

用 GV-II 核酸染料染色 30 min, 之后用蒸馏水泡洗 10 min, 然后在凝胶成像仪下拍照。用 Quantity One 4.6.2 软件进行 DGGE 图谱聚类分析。

1.3 数据分析

1.3.1 Illumina 高通量测序及数据分析 选取第 30 天的阴性对照组和多糖高剂量组的 DNA 样品送上海美吉生物有限公司进行 Illumina Miseq 高通量测序。根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列, 并校正序列方向来进行数据优化。再对优化的数据进行分类学分析, 以得到在各个分类水平上统计各样品的群落组成。通过单样本(α -多样性)分析罗非鱼肠道样品中的微生物菌群丰度和多样性。根据 β -多样性距离矩阵进行层级聚类分析, 可视化地呈现出罗非鱼肠道样本中微生物进化的差异程度。并结合 Heatmap 图对罗非鱼肠道样本进行分析, 由高丰度和低丰度的物种分块聚集, 可知不同分组的样品在各分

类水平上群落组成的相似性和差异性。高通量数据分析均在 I-Sanger 云平台(www.i-sanger.com)上进行, 原始数据已上传到 NCBI(SRP150681)。

1.3.2 统计分析 试验数据用 SPSS 17.0 统计软件的单因素方差分析进行生物学统计, 显著水平为 0.05(差异显著)或 0.01(差异显著)。结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 实验结果与分析

2.1 CAVP 对罗非鱼生长的影响

饲喂添加 CAVP 饲料的罗非鱼生长情况见图 1。由图 1 可以看出, 饲喂 CAVP 15 d 和 30 d 后, 尽管罗非鱼的相对增重率和特定增长率与对照组之间的差异未达到显著水平($P>0.05$), 但相对增重率和特定增长率都有不同程度的升高。本实验饲喂周期较短(30 d), 随着饲喂周期延长, CAVP 对罗非鱼生长的促进作用可能比较明显。

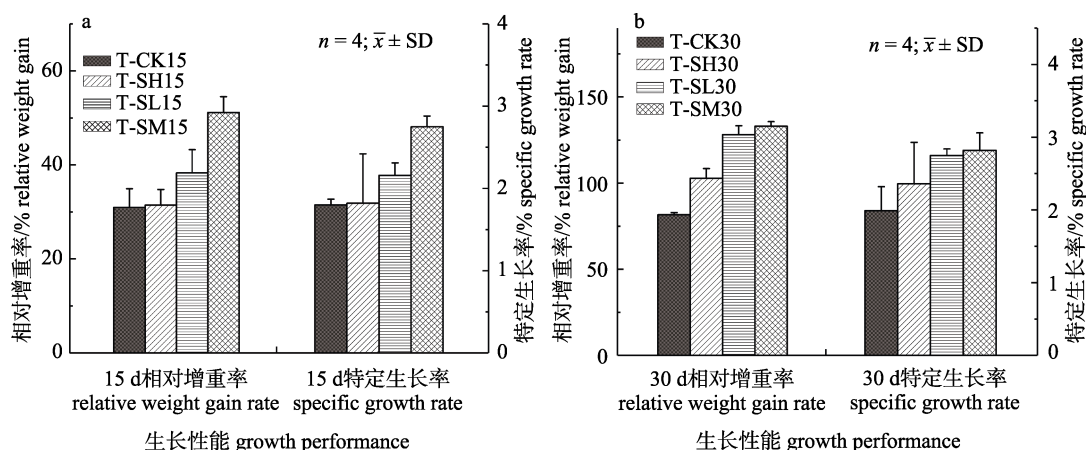


图 1 鲍内脏多糖(CAVP)对罗非鱼生长性能的影响

a. 第 15 天; b. 第 30 天; T-CK、T-SL、T-SM、T-SH 分别代表对照组、CAVP 低、中、高剂量组。

Fig. 1 Effects of abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) on the growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
a. 15 d; b. 30 d; T-CK, T-SL, T-SM, T-SH represent control group, low, medium and high dose of CAVP group, respectively.

2.2 罗非鱼肠道菌群 PCR-DGGE 指纹图谱与分析

罗非鱼各肠道样品 DGGE 电泳图及图谱聚类结果见图 2。饲喂 CAVP 后第 15 天, 对照组样品 T-CK 组单独聚为一类, 与其他处理组样品分开, 说明添加了 CAVP 饲料第 15 天对罗非鱼肠道微生物造成了较明显影响。处理组样品中, 3 个高剂量样品 T-SH151、T-SH152、T-SH153 单独聚为一枝

(相似性 68%), 其他低、中剂量样品较松散地混为一枝, 低、中剂量组对罗非鱼肠道微生物的影响未见明显规律。饲喂 CAVP 第 30 天, 样品聚类结果显示, 除 T-SM303 和 T-SL301 样品外, 各处理组与对照组样品分别聚类, 说明饲喂 CAVP 的处理组样品菌群结构发生了变化。但不同剂量处理组之间无明显聚类规律。

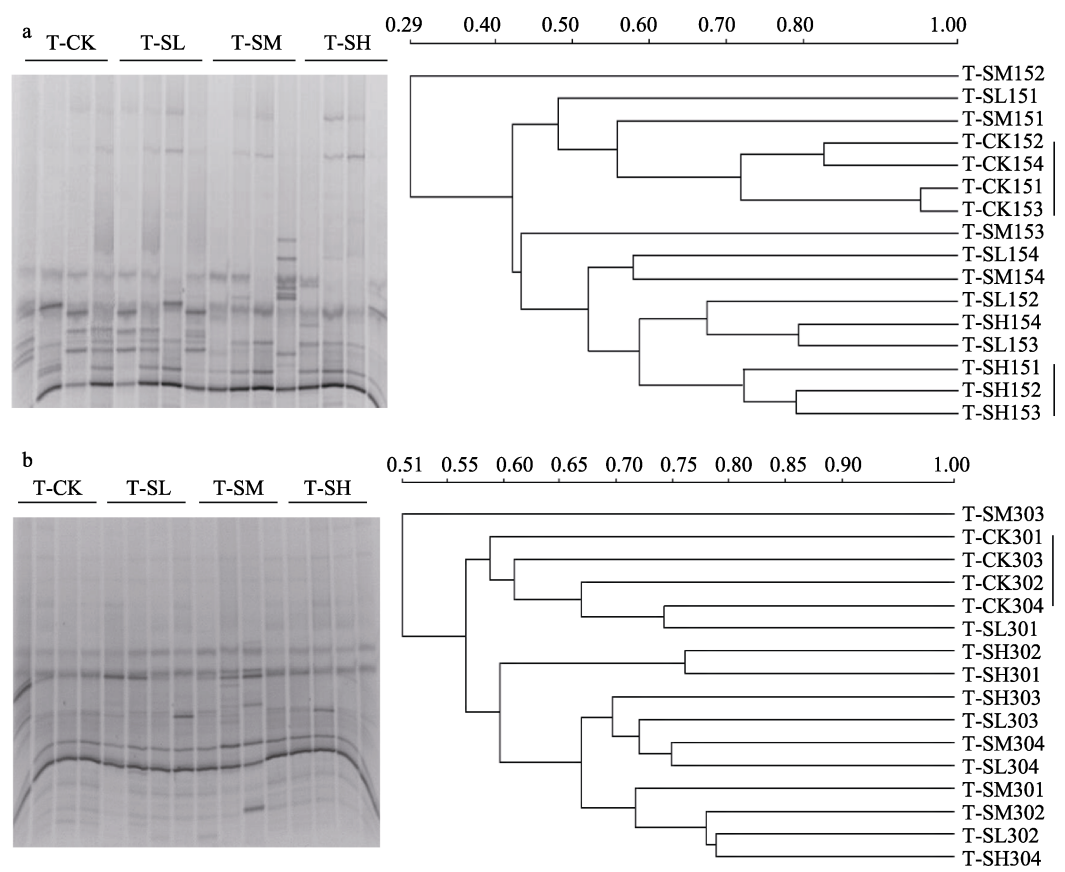


图 2 罗非鱼肠道细菌 16S rDNA V3 区 PCR 产物的 DGGE 图谱和对应的聚类图
a. 第 15 天; b. 第 30 天; T-CK、T-SL、T-SM、T-SH 分别为空白、低、中和高剂量鲍内脏多糖(CAVP)组。
Fig. 2 DGGE profiles of PCR-amplified 16S rDNA fragments (V3 region) of tilapia intestinal microbiota and the corresponding cluster analysis
a. 15 d; b. 30 d; T-CK, T-SL, T-SM and T-SH represent control group, low, medium and high dose of abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) group, respectively.

2.3 Illumina 测序结果及 α -多样性分析

高通量测序共得到 318928 条有效序列, 各样品获得的序列数在 30529~50996 之间, 平均每个样品有 39866 条序列, 两种处理的覆盖率均>0.99, 表明样本的 OUT 足够代表样本的多样性。由于各样品测序深度不同可能会带来多样性分析误差, 因此将样品均一化到 30000 条序列后再进行后续 α -多样性和 β -多样性分析。

α -多样性分析结果见图 3, Shannon 和 Simpson 指数值变化范围分别为 0.53~1.45 和 0.36~0.78。高剂量 CAVP 组的 Chao1 丰富度指数、Faith's PD 指数、Shanon 多样性指数均低于对照组, 其中 Faith's PD 指数的差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。对照组的 Simpson 多样性指数高于处理组, 但差异不显著 ($P<0.05$)。添加 CAVP 可能减少了罗非鱼肠道中的菌群多样性。

2.4 饲喂 CAVP 对罗非鱼肠道微生物群落结构的影响

根据 Bray-Curtis 相似性距离算法矩阵进行层级聚类(Hierarchical clustering)分析, 使用 UPGMA 算法构建罗非鱼肠道细菌群落在不同水平上的树状结构, 结果如图 4。门、纲、目、科、属水平上聚类结果基本一致, 除了个别样品(如 T-CK301)外, 对照组 T-CK 与处理组 T-SH 分别聚为两类, 说明投喂 CAVP 饲料对罗非鱼肠道微生物门、纲、目、科和属水平上都造成了影响。但各样品在 OTU 水平上, 两组样品互相聚类, 没有分开。

2.5 罗非鱼肠道微生物门水平构成及饲喂 CAVP 的影响

罗非鱼肠道样品在门水平上的热图及聚类结果见图 5。罗非鱼肠道菌群由 13 个门和一些未知类群构成, 其中的优势类群梭杆菌门(Fusobacteria)

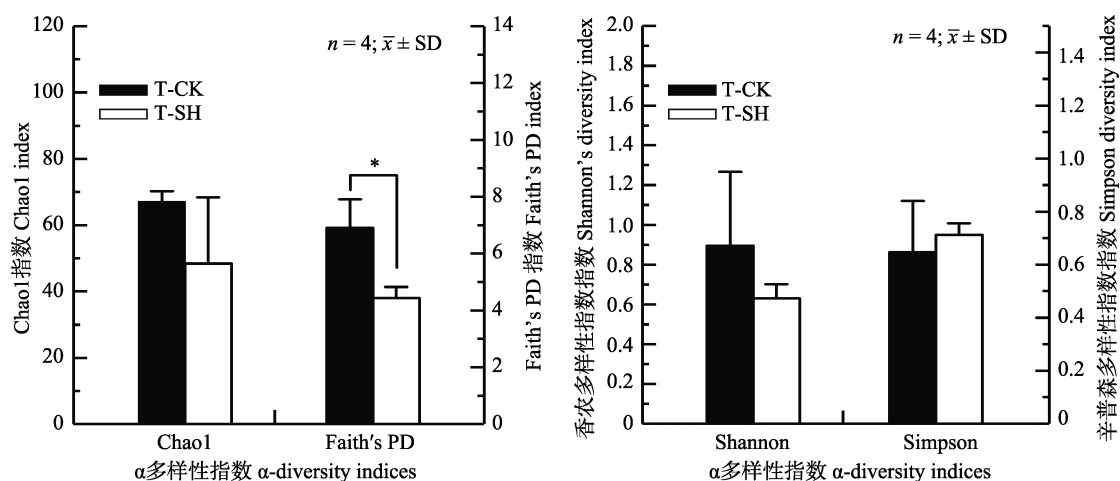


图 3 罗非鱼肠道中细菌群落结构多样性指数

a. Chao1 指数和 Faith's PD 指数; b. 香浓指数和辛普森指数; T-CK 和 T-SH 分别代表对照组和饲喂添加鲍内脏多糖(CAVP)的处理组; 柱形图上方*表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 The α -diversity indices of intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

a. Chao1 index and Faith's PD index; b. Shannon index and Simpson index; T-CK and T-SH indicate control and abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) treated group respectively; * on the column indicates significant difference ($P < 0.05$).

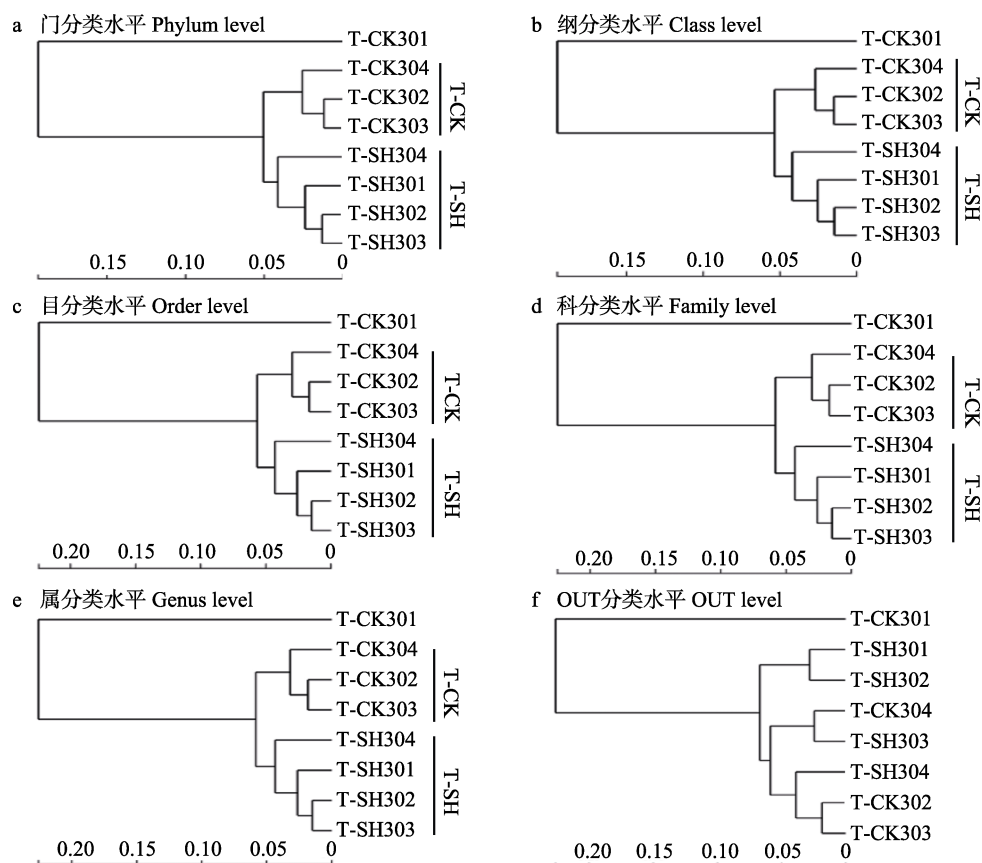


图 4 罗非鱼肠道样品的层级聚类分析

a、b、c、d、e 和 f 分别指门、纲、目、科、属和 OTU 分类水平; T-CK 和 T-SH 分别代表对照组和饲喂添加鲍内脏多糖(CAVP)的处理组。

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of intestinal microbiota in *Oreochromis niloticus*

a, b, c, d, e and f indicate phylum, class, order, family, genus and OUT levels, respectively; T-CK and T-SH indicate control and abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) treated group respectively.

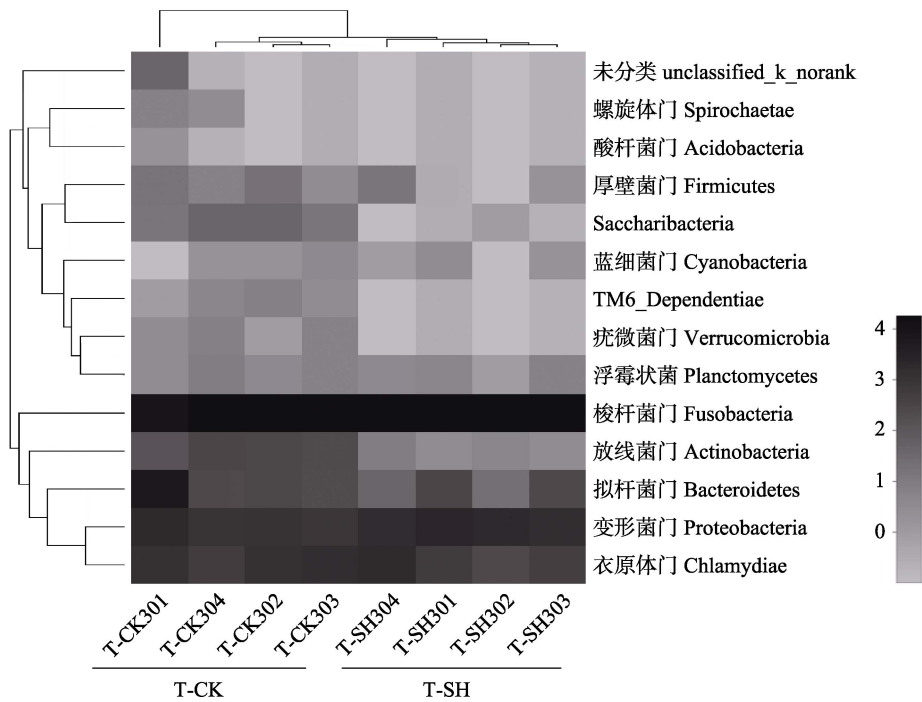


图 5 罗非鱼肠道微生物门水平的热图

T-CK、T-SH 分别代表对照组和饲喂添加鲍内脏多糖(CAVP)的处理组.

Fig. 5 Heatmap of intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) at phylum level

T-CK and T-SH indicate control and abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) treatment group, respectively.

占总序列数的 77.84%。另有一些较丰富类群, 分别为拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria), 占总序列的比例分别为 8.59%、6.18%、5.84%和 1.20%, 其中变形菌门包含 α -和 γ -变形菌纲。此外还有一些数量较少的类群, 如 Saccharibacteria、浮霉状菌(Planctomycetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 尽管这些类群所占比例不到总序列数的 1%, 但这些菌门在各组样品中都存在。还有一些类群如疣微菌门、TM6_Dependentiae、螺旋体门(Spirochaetae)和酸杆菌门(Acidobacteria)以及未被分类到任何门的未知微生物类群, 在个别样品中出现。与对照相比, 投喂添加 CAVP 饲料后, 丰度有所上调的门有梭杆菌门和变形菌门, 丰度显著下调的门有放线菌门、Saccharibacteria、疣微菌门和 TM6_Dependentiae($P<0.05$)。

2.6 罗非鱼肠道微生物属、种水平上的构成及饲喂 CAVP 的影响

在属的水平上, 罗非鱼肠道中共检测到 76 个

属的细菌。选取丰度前 50 的属进行分级聚类并绘制热图, 见图 6。在属的水平上, 罗非鱼肠道中优势菌属为鲸杆菌属(*Cetobacterium*), 占 77.84%, 次优势菌属是新衣原体属(*Neochlamydia*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*), 分别占 5.796%、2.64%和 1.13%, 还有一个紫单胞菌科(Porphyromonadaceae)的未知属, 占 8.29%。此外还有分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、*Alsobacter*、*Aquicella*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、*Alpinimonas* 和一些未知属。与对照相比, 投喂 CAVP 饲料后, 丰度下调的属有: *Neochlamydia*、不动杆菌属、分枝杆菌属、*Alsobacter*、*Aquicella*、假单胞菌属、气单胞菌属、*Alpinimonas* 等。其中分枝杆菌属、*Alsobacter*、*Aquicella* 与对照间差异达到显著水平($P<0.05$); 丰度上调的属有 2 个: 鲸杆菌属和邻单胞菌属, 其中邻单胞菌属的丰度与对照间差异达到显著水平($P<0.05$)。

本实验总共检测出的有效 OUT 有 97 个, 选取丰度前 50 的 OTU 进行分级聚类并绘制热图,

见图 7。其中, 序列能够比对到已知菌种的有 7 个, 按丰度由高到低分别为: 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, 1.06%)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*, 0.58%)、*Aeromonas sharm*-*mana* (0.07%)、耐酪酸豕村菌(*Tsukamurella tyr-*
osinosolvens, 0.06%)、玉米固氮螺菌(*Azospirillum*

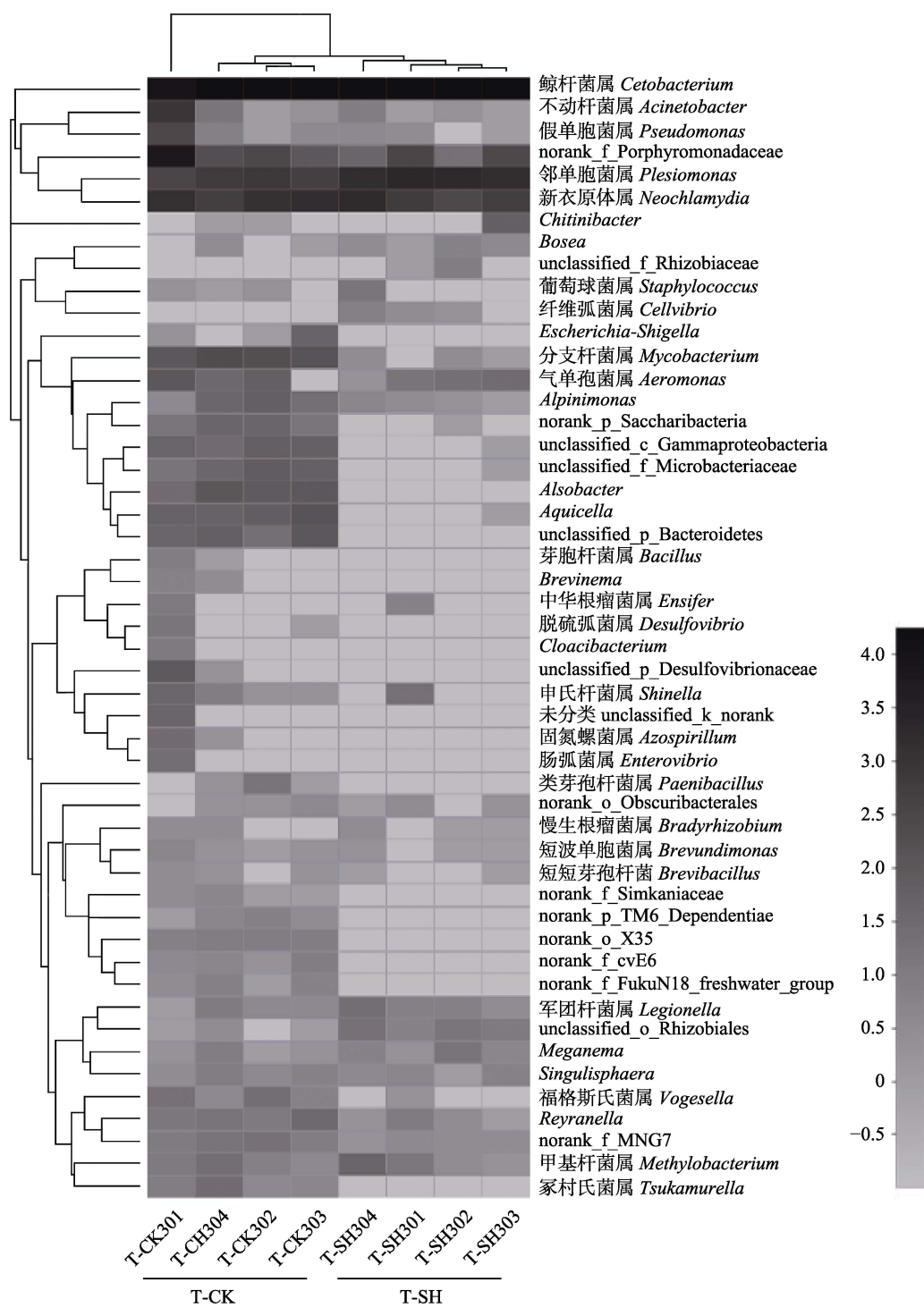


图 6 罗非鱼肠道微生物属水平的热图

T-CK、T-SH 分别代表对照组和饲喂添加 CAVP 的处理组.

Fig. 6 Heatmap of intestinal microbiota of *Oreochromis niloticus* at genus level

T-CK and T-SH indicate control and CAVP treatment group, respectively.

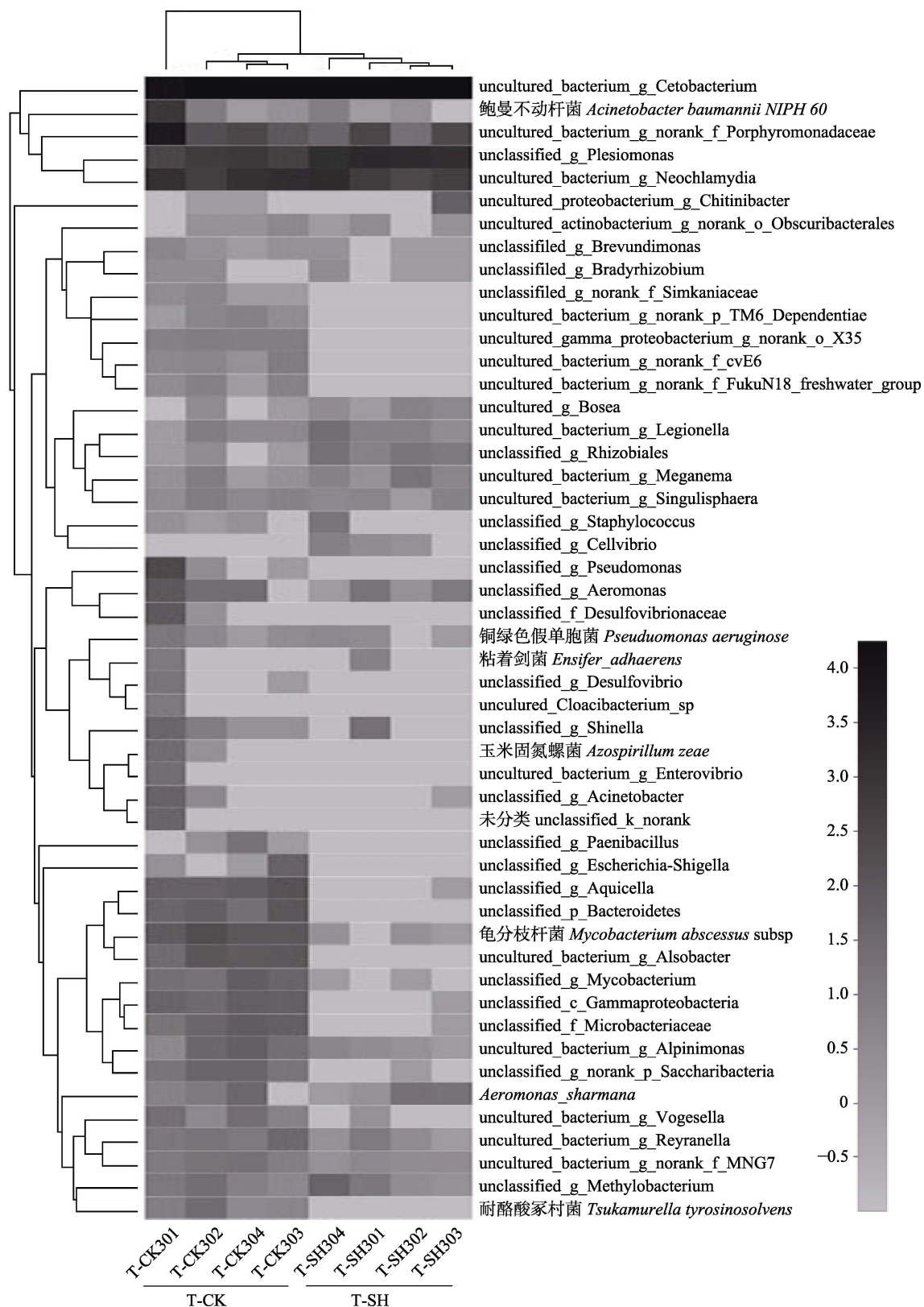


图 7 罗非鱼肠道微生物种分类水平的热图

T-CK、T-SH 分别代表对照组和饲喂添加鲍内脏多糖(CAVP)的处理组。

Fig. 7 Heatmap of intestinal microbiota of *Oreochromis niloticus* at species level

T-CK and T-SH indicate control and abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) treatment group, respectively.

zeae, 0.04%)、铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, 0.03%)、粘着剑菌(*Ensifer adhaerens*, 0.02%)。与对照相比, 投喂 CAVP 饲料后, 这些菌种丰度均不同程度地下调, 其中显著下调的有龟分枝杆菌和耐酪酸豕村菌($P<0.05$)。仅在对照组检测出的菌种有耐酪酸豕村菌、玉米固氮螺菌。

3 讨论

3.1 罗非鱼肠道微生物的群落结构

本研究利用 Illumina 测序技术研究了罗非鱼肠道微生物的构成。对照组和 CVAP 饲喂组中丰度排前 5 位的门是梭杆菌门、拟杆菌门、衣原体门、变形菌门和放线菌门。这些门在斑马鱼(*Danio rerio*)^[15]、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[16]、罗非鱼^[17]和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[18]的肠道优势菌群中都有不同程度的检出。Ray 等^[19]利用 454 焦磷酸测序技术的研究结果表明, 罗非鱼肠道中优势菌群为梭杆菌门、拟杆菌门和变形菌门。Liu 等^[20]也利用 454 焦磷酸测序技术检测到罗非鱼肠道中优势菌门有变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门和放线菌门。这些优势类群均与本研究结果类似。但本研究中检测到的厚壁菌门所占比例很少($<1\%$), 而衣原体门所占比例较多, 这与之前的研究结果有所不同。Ghanbari 等^[21]认为鱼类肠道微生物的构成不仅与宿主的特性密切相关, 还与饮食、环境和生态因素(如鱼的地理学分布)等相关, 是多种因素共同作用的结果。研究表明, 淡水鱼消化道中的主要细菌属包括不动杆菌属、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、乳酸菌属(*Lactococcus*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)及肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的一些菌属^[18, 22-25]。但在本研究中, 罗非鱼肠道的优势菌属为鲸杆菌属(77.84%), 类似的结果在已报道的关于罗非鱼肠道微生物的研究中得以证实^[26-27]。宿主的种属特性是影响肠道菌群组成的关键因素之一^[28-29]。

3.2 饲喂 CAVP 对罗非鱼肠道微生物构成的影响

已有的研究表明, 多糖类益生元可以改善罗非鱼肠道的微生态, 促进有益菌的增殖, 进而抑制有害菌群的生长^[3, 13, 30]。但目前关于益生元的

研究多限于植物性多糖^[31-32]。海洋性多糖由于其特殊活性受到了广泛的关注^[33]。CAVP 作为饲料添加剂应用在水产还未见报道, 其对水产生物的重要器官“肠道微生物”的影响尚不明确。本研究采用 DGGE 和 Illumina 高通量测序技术对投喂 CAVP 对罗非鱼肠道微生物的影响进行了研究。

投喂 CAVP 饲料对罗非鱼肠道微生物造成了影响, 鲍多糖处理组与对照组分别聚类。投喂 CAVP 饲料后, 罗非鱼肠道中一些可能与致病相关的属、种显著下调。分枝杆菌属中有许多菌株被证实和病原菌有关^[34-35]。本研究中检测出的龟分枝杆菌是一种人鱼共患的病原菌^[35-36], 其丰度显著下调。不动杆菌属多为病原菌^[37-38], 丰度显著下调的鲍曼不动杆菌曾经导致鳊(*Siniperca chuatsi*)突发性死亡^[39]; 仅在对照组检测出的皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)也被证明是一种致病菌^[40]。丰度显著下调的耐酪酸豕村菌($P<0.05$), 能引起人体感染产生菌血症^[41]。此外, *Aquicella* 属和 *Alsobacter* 属的丰度也显著下调。*Aquicella* 属中有一些种会引起节肢动物的疾病^[42], 但本研究检出的是未分类的种。*Alsobacter* 属在土壤中也检测出^[43], 但其功能尚不明确。除了上述丰度显著下调的属和种外, 投喂 CAVP 饲料后, 新衣原体属的丰度也下调, 该属隶属于衣原体门, 其中有些种类会引发呼吸道感染, 特别是肺炎^[44], 本研究检测到的也是未分类的种。

投喂 CAVP 后, 丰度上调的属有鲸杆菌属和邻单胞菌属, 其中邻单胞菌属丰度显著上调。鲸杆菌属是在淡水鱼肠道中常见的革兰氏阴性菌^[29, 45-46]。Tsuchiya 等^[46]的研究表明, 鱼体中的鲸杆菌属可产生维生素 B₁₂。Li 等^[45]研究表明鲸杆菌属可以产生醋酸, 醋酸可促进蛋白质及碳水化合物和脂肪的代谢。此外, 鲸杆菌属可以合成供宿主使用的脂肪、蛋白质和碳水化合物, 并在生长和发育中起重要作用。邻单胞菌属中的常见菌是一些条件致病菌, 如食用未煮熟的贝类会导致 *Plesiomonas shigelloides* 感染, 引起腹泻^[47-49]。但 Larsen 等^[29]对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大嘴鲈(*Micropterus salmoides*)和蓝鳃鲈(*Lepomis macrochirus*)研究表明邻单胞菌属也是肠道中的正常菌群。De

la Rosa 等^[50]通过 454 焦磷酸测序技术也发现邻单胞菌属是罗非鱼肠道中的优势属之一。肠道优势菌是益生菌的重要候选菌之一^[29]。本研究检测到的邻单胞菌属只能鉴定到属水平, 种水平暂无分类, 其在鱼肠道中的功能有待进一步研究。

本研究结果进一步证实, 投喂 CAVP 饲料后, 许多跟致病相关的潜在病原菌的丰度降低, 而潜在有益菌的丰度上调。这之前对多糖类益生元^[4, 51]的研究结果一致, CAVP 也具有开发为益生元的潜力。本研究获得了 CAVP 对罗非鱼肠道微生物影响方面的重要信息。但由于方法和数据库信息的限制, 对检测到的差异细菌类群尚需要进一步研究确认, 并对差异细菌进行分离培养, 结合其理化性质进行功能验证, 从而进一步阐明 CAVP 对肠道微生物及宿主的影响。本文为海洋生物活性物质的功效评价提供了新思路, 也为鲍内脏活性物质的开发利用、益生元的研制等奠定理论基础。此外, 本研究在减少环境污染方面也有重要意义。

参考文献:

- [1] Shen D S, Zheng J. Prebiotics and gut microbial ecosystem[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(6): 742-744. [沈定树, 郑静. 益生元与肠道微生态[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(6): 742-744.]
- [2] Gibson G R, Hutkins R, Sanders M E, et al. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2017, 14(8): 491-502.
- [3] Ma X J, Wang L P, Zhao Y, et al. Effects of mannan-oligosaccharides on intestinal microorganisms of tilapia larvae[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 708-713. [马相杰, 汪立平, 赵勇, 等. 甘露寡糖对罗非鱼幼鱼肠道微生物的影响[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 708-713.]
- [4] Lv H Y, Zhou Z G, Rudeaux F, et al. Effects of dietary short chain fructo oligosaccharides on intestinal microflora, mortality and growth performance of *Oreochromis aureus* $\delta \times O. niloticus$ η [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(6): 691-697. [吕慧源, 周志刚, Rudeaux F, 等. 饲喂果寡糖对奥尼罗非鱼 *Oreochromis aurea* $\delta \times O. nilotica$ η 肠道菌群、成活率及生长性能的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(6): 691-697.]
- [5] Shang Q H, Jie Y H, Zhang G G, et al. Immune regulation roles of phytogetic polysaccharides and its mechanisms[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(1): 49-58. [尚庆辉, 解玉怀, 张桂国, 等. 植物多糖的免疫调节作用及其机制研究进展[J]. 动物营养学报, 2015, 27(1): 49-58.]
- [6] Wang J, Wei H C, He C B, et al. Antioxidant activity of polysaccharides from abalone viscera[J]. Food Science, 2017, 38(15): 115-121. [王皎, 魏好程, 何传波, 等. 鲍内脏多糖的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 115-121.]
- [7] Zhang Y H, Jiang B, Liu C J, et al. Extraction technology of polysaccharide in abalone[J]. Journal of Minzu University of China: Natural Sciences Edition, 2011, 20(3): 20-23. [张月红, 姜波, 刘长建, 等. 鲍鱼多糖提取工艺的研究[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(3): 20-23.]
- [8] Miao Y L, Fang F Z, Song W D. Hydrolysis of abalone's viscera using HCl and analysis of the Maillard reaction products[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(4): 54-57. [苗艳丽, 方富永, 宋文东. 鲍鱼内脏的酸水解及其梅拉德反应产物分析[J]. 南方水产科学, 2009, 5(4): 54-57.]
- [9] Suleria H A R, Masci P P, Addepalli R, et al. *In vitro* anti-thrombotic and anti-coagulant properties of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) viscera hydrolysate[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(17): 4195-4205.
- [10] Liu N, Zhu B W, Sun L M, et al. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from abalone gonad[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2011, 30(3): 177-179. [刘娜, 朱蓓薇, 孙黎明, 等. 鲍鱼性腺多糖的体内抗氧化活性[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(3): 177-179.]
- [11] Zhu L L, Sun L M, Li D M, et al. The anti-tumor effect of the proteoglycan from abalone viscera against H₂₂ cell line in vivo[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(5): 478-481. [朱莉莉, 孙黎明, 李冬梅, 等. 鲍鱼内脏蛋白多糖体内对 H₂₂ 肝癌的抑制作用[J]. 营养学报, 2009, 31(5): 478-481.]
- [12] Zhou D Y, Zhu B W, Qiao L, et al. *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera[J]. Food and Bioprocesses Processing, 2012, 90(2): 148-154.
- [13] Wang L P, Ma X J, Leng X J, et al. Effect mannan oligosaccharides on intestinal microflora of tilapia[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(10): 142-145. [汪立平, 马相杰, 冷向军, 等. 甘露寡糖对罗非鱼肠道菌群的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 142-145.]
- [14] Wang J, Wei H C, He C B, et al. Optimization for extracted conditions of abalone viscera[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(8): 3177-3185. [王皎, 魏好程, 何传波, 等. 鲍内脏酶解工艺条件的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3177-3185.]

- [15] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish[J]. The ISME Journal, 2011, 5(10): 1595-1608.
- [16] Wu S G, Tian J Y, Gatesoupe F J, et al. Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(9): 1585-1595.
- [17] Adeoye A A, Jaramillo-Torres A, Fox S W, et al. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota[J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 215: 133-143.
- [18] Han S F, Liu Y C, Zhou Z G. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences[J]. Aquaculture Research, 2010, 42: 47-56.
- [19] Ray C, Bujan N, Tamecki A. Analysis of the gut microbiome of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. fed diets supplemented with previda® and saponin[J]. Journal of Fisheries Sciences, 2017, 11(2): 36-45.
- [20] Liu W S, Wang W W, Ran C, et al. Effects of dietary scFOS and lactobacilli on survival, growth, and disease resistance of hybrid tilapia[J]. Aquaculture, 2017, 470: 50-55.
- [21] Ghanbari M, Kneifel W, Domig K J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing[J]. Aquaculture, 2015, 448: 464-475.
- [22] Ni J J, Yan Q Y, Yu Y H, et al. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(3): 704-714.
- [23] Saha S, Roy R N, Sen S K, et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes)[J]. Aquaculture Research, 2010, 37(4): 380-388.
- [24] Trust T J, Sparrow R A. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1974, 20(9): 1219-1228.
- [25] Ye L, Amberg J, Chapman D, et al. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish[J]. The ISME Journal, 2014, 8(3): 541-551.
- [26] Xia Y, Lu M X, Chen G, et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 368-379.
- [27] Donkeng N N, Maiwore J, Ngouné L T, et al. Characterization of the bacterial flora of tilapia (*Oreochromis niloticus*) harvested from four lakes in the north of Cameroon[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(71): 16016-16023.
- [28] Egerton S, Culloty S, Whooley J, et al. The gut microbiota of marine fish[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 873.
- [29] Larsen A M, Mohammed H H, Arias C R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm-water fish species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(6): 1396-1404.
- [30] Tian J, Sun L W, Wen H, et al. Effect of dietary chitoooligosaccharides on growth performance, gut flora and intestinal structure of juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 561-568. [田娟, 孙立威, 文华, 等. 壳寡糖对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、前肠组织结构及肠道主要菌群的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 561-568.]
- [31] Gu H J, Wang Y, Xi H, et al. Effects of grifola frondosa polysaccharides on non-specific immunity in Nile tilapia[J]. Fisheries Science, 2013, 32(8): 453-458. [顾华杰, 王琰, 奚红, 等. 灰树花多糖对罗非鱼非特异性免疫力的影响[J]. 水产科学, 2013, 32(8): 453-458.]
- [32] Huang Y Z, Lin X, Wang Q X, et al. Effects of astragalus polysaccharide on structure of intestinal villus and intestinal immunocyte of tilapia[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(1): 108-116. [黄玉章, 林旋, 王全溪, 等. 黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态结构及肠道免疫细胞的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 108-116.]
- [33] Brito T V, Barros F C N, Silva R O, et al. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 151: 957-964.
- [34] Novotný L, Dvorská L, Lorencová A, et al. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. a review[J]. Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic), 2004, 49(9): 343-358.
- [35] Zhang D F, Li A H, Gong X N. Research on the mycobacteriosis and its pathogen in sturgeons[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3): 495-504. [张德锋, 李爱华, 龚小宁. 鲟分枝杆菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 495-504.]
- [36] Shanmugham B, Pan A. Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen mycobacterium abscessus: a novel hierarchical in silico approach[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59126.
- [37] Peleg A Y, Seifert H, Paterson D L. *Acinetobacter baumannii*

- nii: emergence of a successful pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(3): 538-582.
- [38] Sahl J W, Mariateresa D F, Spyros P, et al. Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15188.
- [39] Tang Y S, Lu C P. Antimicrobial susceptibility testing of acinetobacter strains isolated from animal specimens[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1997, 20(3): 120-123. [汤雅殊, 陆承平. 动物源不动杆菌的药敏试验[J]. *南京农业大学学报*, 1997, 20(3): 120-123.]
- [40] Pandey P K, Verma P, Kumar H, et al. Comparative analysis of fecal microflora of healthy full-term Indian infants born with different methods of delivery (vaginal vs cesarean): *Acinetobacter* sp. prevalence in vaginally born infants[J]. *Journal of Biosciences*, 2012, 37(S1): 989-998.
- [41] Karunakaran R, Halim H A, Ng K P, et al. *Tsukamurella tyrosinosolvens* intravascular catheter-related bacteremia in a haematology patient: a case report[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Science*, 2011, 15(11): 1343-1346.
- [42] Santos P, Pinhal I, Rainey F A, et al. Gamma-proteobacteria *Aquicella lusitana* gen. nov., sp. nov., and *Aquicella siphonis* sp. nov. infect protozoa and require activated charcoal for growth in laboratory media[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6533-6540.
- [43] Bao Z H, Sato Y, Fujimura R, et al. *Alsobacter metallidurans* gen. nov., sp. nov., a thallium-tolerant soil bacterium in the order *Rhizobiales*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(3): 775-780.
- [44] Vouga M, Diabi H, Boulos A, et al. Antibiotic susceptibility of *Neochlamydia hartmanellae* and *Parachlamydia acanthamoebae* in amoebae[J]. *Microbes and Infection*, 2015, 17(11-12): 761-765.
- [45] Li T T, Long M, Gatesoupe F J, et al. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(1): 25-36.
- [46] 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.
- [47] Holmberg S D, Wachsmuth I K, Hickman-Brenner F W, et al. *Plesiomonas* enteric infections in the United States[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1986, 105(5): 690-694.
- [48] Holmberg S D, Farmer J J III. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections[J]. *Reviews of Infectious Diseases*, 1984, 6(5): 633-639.
- [49] Niedziela T, Lukasiewicz J, Jachymek W, et al. Core oligosaccharides of *Plesiomonas shigelloides* O54:H2 (Strain CNCTC 113/92): structural and serological analysis of the lipopolysaccharide core region, the o-antigen biological repeating unit, and the linkage between them[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(14): 11653-11663.
- [50] De La Rosa M G N. Preliminary evaluation of the bacterial populations associated with the intestinal tract of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to essential oils of oregano in the diet[D]. Bogotá: National University of Colombia Faculty of Sciences, 2011.
- [51] Zhao L P, Zhang F, Ding X Y, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. *Science*, 2018, 359(6380): 1151-1156.

The influence of feeding CAVP on intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WU Zhencong¹, ZHANG Shasha¹, YANG Zhuan¹, XIONG Hejian², MA Ying¹

1. Fisheries College, Jimei University; Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

2. Food and Biological College, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: The nutrient content of abalone viscera is similar to that of muscle. It contains rich proteins and various biologically active substances. However, the abalone viscera are often abandoned when processing or during consumption of abalone. This is not only a great waste, but also causes pollution to the environment. In recent years, with the exploration and research of marine active substances, abalone viscera have also been studied and developed. Intestinal microorganisms are known as “external organs” of the host, they are directly involved in the host's nutrition, immunity, metabolism, and so on. They play important roles in maintaining the health of the host. A few studies have reported the in vitro and in vivo antioxidant activity of abalone polysaccharides and polypeptides; however, the effects of abalone active substances on the intestinal microorganism have not been previously reported. In this paper, the intestinal microbiota of tilapia and the influence of feeding abalone visceral crude polysaccharide (CAVP) on the intestinal microbiota were studied by PCR-DGGE and Illumina MiSeq sequencing. A total of 13 bacterial phyla were detected in the intestines of tilapia: Fusobacteria (77.84%) was the dominant phylum, Bacteroidetes (8.59%), Chlamydiae (6.18%), Proteobacteria (5.84%), and Actinobacteria (1.20%) were the subdominant phyla. Saccharibacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, TM6_Dependentiae, Cyanobacteria, Spirochaetae, Acidobacteria, and some unknown groups were also detected. At the genus level, *Cetobacterium* (77.84%) was the dominant genus, *Neochlamydia* (5.80%), *Plesiomonas* (2.64%), and *Acinetobacter* (1.13%) were the subdominant genera. There was also an unknown genus of the family Porphyromonadaceae, accounting for 8.29%. In addition, *Mycobacterium*, *Alsobacter*, *Aquicella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alpinimonas*, and some unknown genera were also detected. The addition of CAVP diet had an obvious influence on the intestinal microbiota of tilapia because the CAVP-treated samples and the control samples without CAVP clustered separately. After feeding CAVP, the abundance of Actinobacteria, Saccharibacteria, Verrucomicrobia, and TM6_Dependentiae decreased significantly ($P < 0.05$). At the genus level, the abundance of *Plesiomonas* and *Cetobacterium* was up-regulated, whereas the *Neochlamydia*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Alsobacter*, *Aquicella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, and *Alpinimonas* decreased, of which the abundance of *Mycobacterium*, *Alsobacter*, *Aquicella*, and *Plesiomonas* decreased significantly compared with that of the control ($P < 0.05$). After feeding CAVP, the abundance of some pathogens, such as *Mycobacterium abscessus*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sharmans*, *Tsukamurella tyrosinosolvens*, and *Pseudomonas aeruginosa* decreased, in which the *Mycobacterium abscessus* and *Tsukamurella tyrosinosolvens* decreased significantly compared with that of the control ($P < 0.05$). On the other hand, the probiotic bacteria, such as *Cetobacterium*, increased. This study investigated the effects of CAVP on the host with regard to intestinal microbes; it provides insight into the efficient evaluation of marine active substances, and also lays a theoretical foundation for the development and utilization of bioactive substances and the development of prebiotics from abalone viscera. In addition, this study is of importance in recycling abalone viscera and reducing environmental pollution.

Keywords: intestinal microbiota; abalone visceral crude polysaccharide (CAVP); Illumina MiSeq sequencing; *Oreochromis niloticus*

Corresponding author: MA Ying. E-mail: maying@jmu.edu.cn