

DOI: 10.12264/JFSC2024-0109

基于 16S rRNA 高通量测序技术的长江口刀鲚肠道微生物多样性研究

杨国祥^{1,2}, 李丹^{1,3}, 于雯雯¹, 李士虎³, 施金金¹, 汤建华¹, 孟乾¹, 汤承诺^{1,3}, 岑永华⁴

1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007;
2. 上海海洋大学海洋生物资源与管理学院, 上海 201306;
3. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005;
4. 江苏省海域执法监督中心, 江苏 南通 226006

摘要: 为探究刀鲚(*Coilia nasus*)肠道微生物多样性随食物组成变化的特征, 采用 16S rRNA 高通量测序技术对 3 个不同体长组(L1: ≤ 140 mm, L2: 141~200 mm, L3: ≥ 201 mm)的长江口刀鲚肠道样品进行肠道微生物多样性分析。实验结果显示: 胃含物分析表明不同体长组刀鲚均以桡足类和线虫类为主要饵料类群, 根据聚类结果发现 L1 单独聚为一类, L2 和 L3 聚为一类。肠道样本共鉴定出微生物 726 个属, 378 个科, 隶属于 30 个门, 在门分类水平上, 刀鲚不同组间的优势菌群相似, 均主要以放线菌门(Actinobacteriota)和变形菌门(Proteobacteria)构成, 而浮霉菌门(Planctomycetota)仅存在于 L3 组肠道中; 在属分类水平上, 红球菌属(*Rhodococcus*)是不同体长组刀鲚肠道中的共有优势菌属, 在 L1 组中丰度最高(82.0%), L3 组最低(27.0%), 发光杆菌属(*Photobacterium*)在 3 组间均有一定的占比。Alpha 多样性分析发现刀鲚肠道微生物多样性随体长的增加而增加。利用 Bray-Curtis 距离算法进行聚类分析发现不同组间肠道微生物聚类结果与胃含物分析的聚类结果一致, 即 L1 单独聚为一类, L2 和 L3 聚为一类, 说明食物组成与肠道菌群的组成密切相关; PCoA 分析表明, L1 与另外两组样本明显分离, L2 和 L3 样本聚在一起, 说明组间肠道菌群存在差异。本研究揭示了刀鲚的食物组成、摄食习性和生活环境与肠道微生物群落结构组成密切相关, 为刀鲚资源的保护和合理开发提供科学依据。

关键词: 刀鲚; 食物组成; 16S rRNA; 肠道菌群; 微生物多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)09-1105-11

刀鲚(*Coilia nasus*), 又称长颌鲚, 也叫刀鱼、毛花鱼, 隶属于鲱形目(Clupeiformes), 鲚科(Engraulidae), 鲚属(*Coilia*)^[1-2]。刀鲚分布于西太平洋区的中国、朝鲜沿海和日本有明海域, 其中我国主要分布于东海、黄海以及长江、钱塘江等江河流域^[3]。刀鲚鱼肉鲜嫩肥美, 营养丰富, 是长

江重要的经济鱼类之一, 但近年来, 由于水利工程的修建、高强度捕捞、围垦活动等原因, 导致长江口刀鲚产卵场遭到破坏、栖息地环境恶化、资源量下降, 长江口刀鲚濒临灭绝, 并表现出低龄化和小型化的特点^[4]。得益于 2020 年长江全面禁捕, 长江口刀鲚繁殖群体的繁殖性能和健康状

收稿日期: 2024-04-12; 修订日期: 2024-07-10.

基金项目: 中央农业产业发展资金-我国近岸近海外海渔业资源调查养护项目; 省农业农村厅“江苏省渔业生态与资源监测”项目(2023-SJ-137); 南通市青年基金项目(JC2023029); 南通市基础科学研究项目(JC2022040); 南通市社会民生重点项目(MS22021015).

作者简介: 杨国祥(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源. E-mail: 1330786081@qq.com

通信作者: 于雯雯, 女, 副研究员, 博士, 研究方向为海洋生态与渔业资源. E-mail: jshyyww@163.com

况变得良好^[5]。

鱼类肠道微生物群落是鱼体的重要组成部分,在维持宿主生长发育、肠道健康、营养代谢、能量吸收和免疫应答等过程中发挥着重要作用^[6-10]。鱼类肠道微生物群落的形成十分复杂,其微生物菌群组成除与鱼体本身相关,还受鱼体的生长发育阶段、食物组成、性别和环境因子等因素影响,其中食物组成是影响肠道微生物种类和数量的最主要因素之一^[11],也是改变肠道菌群组成和代谢变化的重要因素^[12]。因此,鱼类食物组成的差异可以通过肠道微生物组成结构变化来体现,而肠道微生物组成也可以揭示其不同发育阶段食物组成的变化^[13]。

目前关于不同生长发育阶段的洄游型刀鲚,消化不同来源的食物后,其肠道微生物群落结构适应性变化还未有较多研究报道。为此,本研究以长江口刀鲚为研究对象,采用 16S rRNA 高通量测序技术对刀鲚不同发育阶段肠道微生物 V3~V4 高变区进行测定,探究刀鲚不同发育阶段随食物组成变化,宿主肠道菌群的群落结构特征,以期对刀鲚资源的保护和合理开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

刀鲚样品取自 2022 年 3 月长江口临近海域渔业资源多样性监测调查的张网渔获物,调查站位如图 1,按照《海洋渔业资源调查规范》和《海洋监测规范》进行样品采集,监测网具为单桩张网张网,网具规格为 100.0 m×54.9 m (结附网衣的网口网长×网衣纵向拉紧总长),样品冷冻保存。

1.2 样品处理

刀鲚样品解冻后进行生物学测定,根据体长范围将其分成 3 个体长组,即体长≤140 mm 为小型刀鲚,141~200 mm 为中型刀鲚,≥201 mm 为大型刀鲚,并依次编号 L1、L2、L3。表 1 列出了不同体长组刀鲚的胃和肠道取样信息。

将不同体长组的刀鲚样品放在无菌操作台上进行处理,所有实验工具均提前进行灭菌处理。首先用 75%乙醇将刀鲚体表进行擦拭消毒,随后用灭菌的眼科剪在刀鲚的泄殖孔(肛门)处横着剪

开一个小口,随后用剪刀沿着这个小口竖着向上将刀鲚腹部剪开,取胃放入密实袋,置于-80℃超低温冰箱中冷冻保存,然后用灭菌的镊子将整个肠道轻挑出来,并分离出肠道,用剪刀从刀鲚的小肠上端将肠道剪下,放入 PBS 缓冲液中将肠道外壁的黏膜冲洗掉,将处理好的肠道样品收集于提前做好标记的 2 mL 离心管中,立即放入液氮中速冻,随后放入-80℃超低温冰箱保存。每取完一条鱼的肠道后,用纯水对眼科剪和镊子进行清洗,并在酒精灯上再次进行灭菌。由于所选取的刀鲚样品规格差距较大,每组样品的肠道取样数量根据鱼的大小分别取样,每组设置 3 个平行,即 L1 (20 尾×3)、L2 (15 尾×3)、L3 (10 尾×3),每组的 3 个平行样品分别合并成为一个样本,共 9 个样本,每个样本的重量均大于 0.2 g,满足 16S rRNA 肠道微生物测序的样本质量要求。

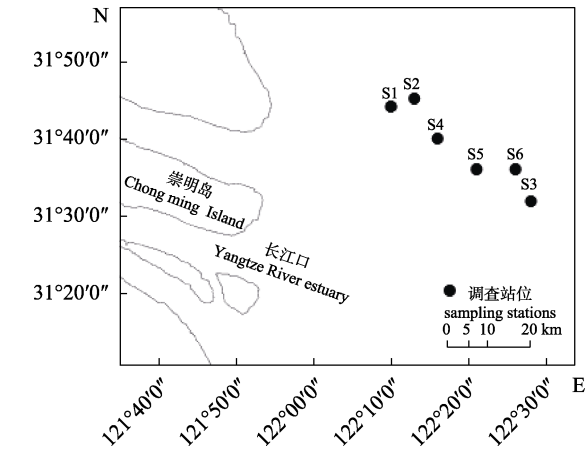


图 1 调查海域及站位分布
Fig. 1 Investigation sea area and sampling stations

表 1 各体长组刀鲚胃肠样品信息
Tab. 1 Information of the stomach and intestine samples from different body length groups of *Coilia nasus*

体长组 size class	胃数量/个 number of stomachs	肠道数/个 number of intestines
L1 (≤140 mm)	499	20×3
L2 (141~200 mm)	132	15×3
L3 (≥201mm)	180	10×3

1.3 胃含物分析方法

将刀鲚的胃进行解冻,用吸水纸将表面的水分吸干,用精度为 0.001 g 的电子天平称重,在体视显微镜下将胃中饵料生物的种类进行鉴定,烧

足类根据剩余残体的头胸甲、附肢来鉴别种类^[14]; 虾类通过大额鉴定种类^[14]; 鱼类通过耳石进行种类鉴定^[15-16]。尽可能鉴定到最小分类单元, 并计数和称重。

1.4 肠道内容物总 DNA 提取和 16S rDNA 基因扩增

将采集到的 L1 组、L2 组和 L3 组所有肠道组织(含内容物)样品置于干冰中运送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序分析。DNA 提取和测序步骤如下: (1) 根据 FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Norcross, GA, U.S.)试剂盒对刀鲚肠道微生物群落总 DNA 进行提取, 使用分光光度计和 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。(2) 使用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTA CHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 云平台进行测序分析(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.5 数据处理

胃含物分析计算公式如下; 用 SPSS 2021 软件对各体长组刀鲚饵料生物组成进行聚类分析, 分析前将出现频率($F\%$)进行平方根转化, 去除不可辨饵料生物^[17], 以种为分类阶元, 聚类方法为瓦尔德法(ward), 测量区间采用欧式距离(euclidean distance)^[18], 得到组间聚类谱系图。

$$\text{质量百分比}(W\%) = \frac{\text{某饵料生物的实际质量}}{\text{饵料生物总质量}} \times 100\%$$

$$\text{个数百分比}(N\%) = \frac{\text{某饵料生物的个数}}{\text{饵料生物总个数}} \times 100\%$$

$$\text{出现频率}(F\%) = \frac{\text{某饵料生物的出现次数}}{\text{实胃数}} \times 100\%$$

$$\text{相对重要性指数}(IRI) = (W\% + N\%) \times F\%$$

$$\text{相对重要性指数百分比}(IRI\%) = \frac{IRI}{\sum IRI} \times 100\%$$

利用 fastp v0.20.0^[19]、Flash v1.2.7^[20]和 UPARSE v7.1^[21]对刀鲚肠道微生物群落测序原始数据进行质控(quality control)、过滤(quality filtered)、拼接(merged)和去除嵌合体(chimera removed), 得到相似性在 97%以上的 OTU 序列表格, 基于此表格对刀鲚肠道微生物物种组成、

Alpha 多样性、Beta 多样性、ASV 韦恩图、主坐标成分和显著性差异菌群进行分析。

用 Alpha 多样性来描述刀鲚肠道微生物群落的物种丰富度和多样性, 以 ACE 指数和 Chao1 指数表征丰富度, 以 Shannon 指数和 Simpson 指数表征多样性, 以 Coverage 指数表征覆盖度, 计算公式:

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}} \gamma_{ACE}^2$$

$$\gamma_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{10} i(i-1)F_i}{C_{ACE} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

$$C_{ACE} = 1 - \frac{F_1}{N_{rare}}$$

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{10} iF_i$$

式中, S_{abund} 为高丰度物种(丰度>10); S_{rare} 为稀有物种(丰度≤10 且不为 0); F_1 为丰度为 1 的物种; C_{ACE} 为样本覆盖度的估计值; γ_{ACE}^2 为稀有物种的变异系数。

$$\text{Chao1} = \text{Sobs} + n_1(n_1 - 1) / 2(n_2 + 1)$$

式中, Chao1 为估计的 OTU 数; Sobs 为观测到的 OTU 数; n_1 为只有 1 条序列的 OTU 数目为 n_2 为只有 2 条序列的 OTU 数目。

$$H_{\text{Shannon}} = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

$$D_{\text{Simpson}} = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

式中, S 为物种数目; P_i 为属于种 i 的个体在全部个体中的比例。

Beta 多样性是通过聚类分析(UPGMA)和主坐标分析(PCoA)来比较不同生态系统之间的差异, 反映生物种类因环境所造成异质性。ANOSIM 是基于相似性(距离矩阵)的非参数检验, 由于不求数据正态分布和方差齐性, 非常适用于微生物群落这种样本分布不确定的复杂分析。

LEfSe 分析一般用以强调统计学意义和生物学相关性, 采用该分析方法可以检测刀鲚不同组间的差异菌群, 以作为区分不同体长组间刀鲚肠

道的微生物标记。

2 结果与分析

2.1 胃含物分析结果

对 811 尾刀鲚进行胃含物分析,根据相对重要性指数百分比(IRI%),表明不同体长组刀鲚均以桡足类和线虫类为主要饵料类群(表 2),但桡足类和线虫类的占比在不同组间变化较大。根据聚类分析可以将 3 个体长组的食物组成为两大类,即 L1 聚为一类(≤ 140 mm),L2 和 L3 聚为一类(>140 mm)(图 2),即随着体长的增长,L2 和 L3 刀鲚摄食桡足类的占比逐渐下降,十足类和线虫类的占比逐渐增加,且摄食的饵料种类增多。

2.2 OTU 数量和稀释度曲线

利用 Illumina 公司 MiSeq PE300 平台对刀鲚不同体长组共 9 个肠道样品进行 16S rRNA 测序分析,对所有样本序列进行抽平,使其达到相同的测序深度(每个样本 33201 读数),共获得 298809 条有效序列,根据 97%的相似度进行 OTU 分类,共获得 1489 个 OTU。利用 OTU Sobs 稀释浓度曲线来检测刀鲚肠道菌群的测序深度和物种

丰富度(图 3),从图中可以看出随刀鲚肠道样本量的增加,稀释度曲线趋于平缓,显示了清晰的渐进线,说明测序量充足,表明本研究中对刀鲚肠道菌群的采样接近完整,能代表本研究样品中的物种多样性。

表 2 刀鲚主要饵料种类出现频率百分比(F%)和相对重要性指数百分比(IRI%)

Tab. 2 Frequency of occurrence (F%) and percentage of relative importance index (IRI%) of main feed species of *Coilia nasus*

食物组成	%					
	L1		L2		L3	
	F%	IRI%	F%	IRI%	F%	IRI%
端足类 Amphipoda	2.6	0.5	0.8	0.0	2.2	0.1
多毛类 Polychaeta	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.1
糠虾类 Mysidacea	1.2	0.3	3.0	1.2	1.1	0.3
涟虫类 Cumacea	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
桡足类 Copepoda	80.2	74.2	64.4	35.3	45.6	33.6
十足类 Decapoda	0.0	0.0	3.8	3.4	10.6	13.9
吸虫类 Trematoda	4.7	0.4	5.3	0.3	7.8	1.0
线虫类 Nematoda	28.1	24.3	45.5	59.8	39.4	47.1
樱虾类 Sergestidae	0.6	0.2	0.0	0.0	5.0	3.4
鱼类 Pisces	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.6

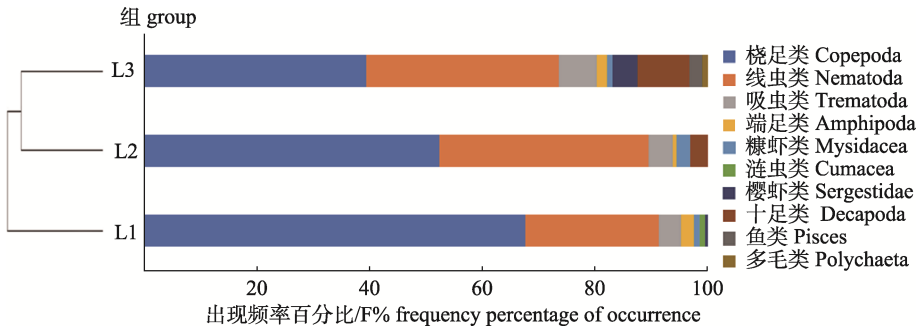


图 2 刀鲚不同体长组食物组成聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of food composition of *Coilia nasus* for different body length groups

2.3 肠道菌群组成与结构分析

通过对 3 组样本的肠道微生物组成分析,共鉴定出 726 个属,378 个科,隶属于 30 个门。如图 4a 所示,在门分类水平上,刀鲚不同组间的优势菌群种类相似,均主要以放线菌门(Actinobacteriota)和变形菌门(Proteobacteria)构成,但优势菌门在 3 组中有较大差异。L1 组以放线菌门(84.1%)为主要优势菌门,变形菌门(11.8%)为次优势菌门;L2 组

和 L3 组以变形菌门(53.6%、53.1%)为主要优势菌门,放线菌门(38.1%、28.7%)为次优势菌门;其中浮霉菌门(Planctomycetota)(1.0%)仅在 L3 组这类大个体刀鲚中检测到,L1 和 L2 等中小型个体中均不存在。3 种体型刀鲚的肠道中放线菌门和变形菌门均占细菌相对丰度的 80%以上,这一结果表明放线菌门和变形菌门是刀鲚肠道的优势菌门。

取属水平丰度前 10 的菌属进行分析,如图 4b

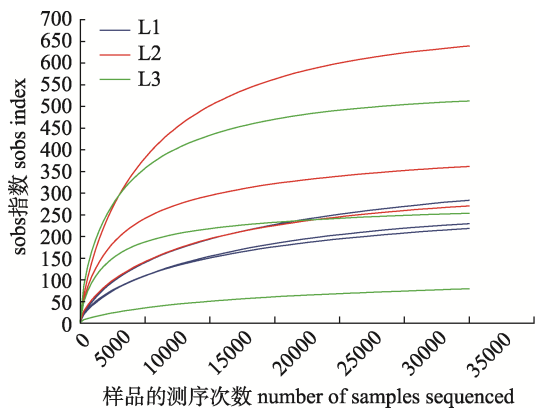


图 3 刀鲚不同体长组肠道菌群样品的稀释曲线
Fig. 3 Dilution curves of intestinal microbial samples of *Coilia nasus* in different body length groups

所示,不同组间刀鲚肠道菌群的丰度差异较大。红球菌属(*Rhodococcus*)是不同体长组刀鲚肠道中

的共同优势菌属,在 L1 组中丰度最高(82.0%), L3 组中最低(27.0%),说明随体长的增长,红球菌属占比逐渐下降;发光杆菌属(*Photobacterium*)在 3 组间均存在一定的占比,是 L2 和 L3 的共同优势菌属,但发光杆菌属在 L1 中的丰度较低,说明随着体长的增长这种菌属丰度逐渐增加;红球菌属、发光杆菌属、另类弧菌属(*Aliivibrio*)属和代尔夫特菌属(*Delftia*)是 L2 中的优势菌属,且另类弧菌属仅在 L2 组出现;红球菌属、发光杆菌属和其他菌群(序列百分比 $\leq 1\%$)和螺旋菌门属(*Spirochaetota*)是 L3 中的优势菌属,其中螺旋菌门属仅在 L3 组中出现。以上结果表明,随着刀鲚个体大小的增加,刀鲚肠道中的微生物种类也增多,这可能与不同体型刀鲚的摄食习性有关。

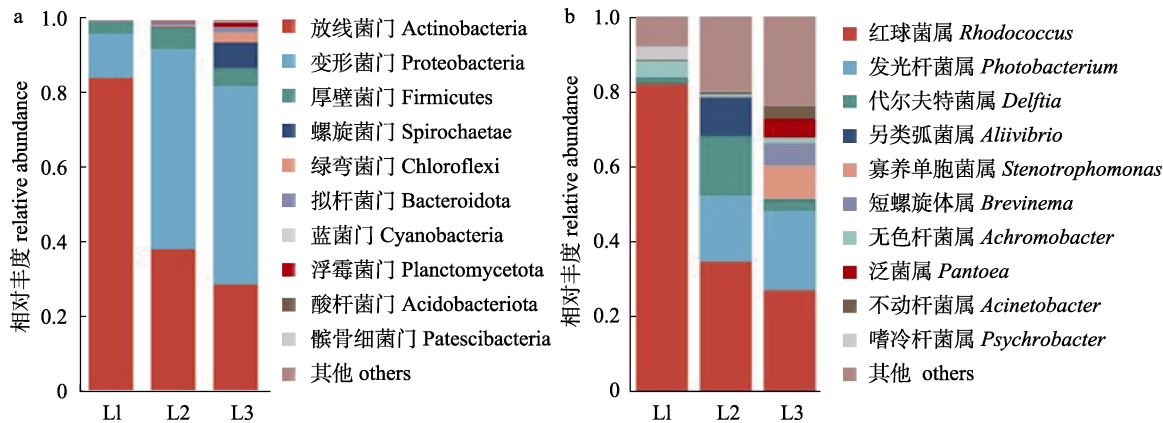


图 4 刀鲚不同体长组肠道菌群在不同分类水平上的相对丰度
a: 门水平; b: 属水平.

Fig. 4 Relative abundance of gut microbiota for different body length groups of *Coilia nasus* at different taxonomic levels
a: phylum level; b: genus level.

2.4 Alpha 多样性分析

对刀鲚不同体长组肠道菌群 Alpha 多样性进行分析,结果显示 L2 组肠道菌群 ACE 指数和 Chao1 指数最大,其次是 L3 组,最后是 L1 组,表明 L2 组刀鲚肠道菌群的丰富度最高, L1 组最低, Shannon 指数在 L1 组中最低, L2 和 L3 组相同, 但 L3 组刀鲚肠道菌群分布更广泛, 表明刀鲚肠道微生物多样性随体长增加而增加, Simpson 指数显示 L2 组最小, L1 组最大, 表明 L2 组刀鲚肠道微生物群落多样性最高, L1 组最低(表 3), Simpson 指数差异可能是由于 L2 组和 L3 组刀鲚肠道取样的质量存在差异。

表 3 刀鲚不同体长组肠道菌群 Alpha 多样性指数分析
Tab. 3 Alpha diversity indices of intestinal microbiota of *Coilia nasus* in different body length groups

样本 sample	丰富度 richness		多样性 diversity		覆盖度/% coverage
	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	
L1	284.7±58.5	290.7±54.6	1.1±0.2	0.7±0.1	99.9±0.0
L2	424.4±218.0	430.1±214.1	2.4±0.8	0.2±0.1	99.9±0.0
L3	309.5±219.6	317.0±216.6	2.4±1.4	0.3±0.2	99.9±0.0

2.5 Beta 多样性分析

韦恩图(图 5)表示组间共享或特有的 OTU。L1、L2 和 L3 分别观察到 448 个、886 个和 707 个 OTU。L1、L2 和 L3 序列文库共享 164 个 OTU,

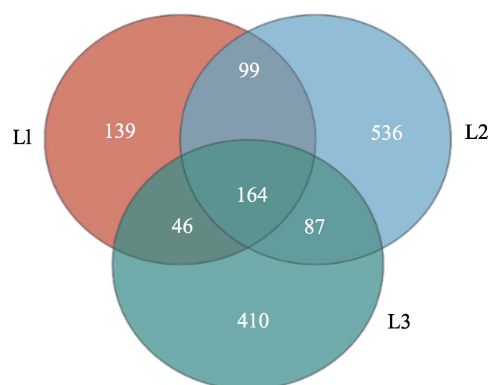


图 5 刀鲚不同体长组肠道菌群中 OTU 重叠的 Venn 图
图中的重叠部分代表 3 组中共享 OTU 的数目, 非重叠部分的数字代表对应中所特有的 OTU 数目。

Fig. 5 Venn diagram of OTU overlap in gut microbiota of different body length groups of *Coilia nasus*

The overlapping parts of the figure represent the number of shared OTUs in the three groups, and the numbers in the non-overlapping parts represent the number of OTUs unique to their counterparts.

L1 和 L2 共享 99 个 OTU, L1 和 L3 共享 46 个 OTU, L2 和 L3 共享 87 个 OTU, 从组间特有的 OTU 数目来看, L1 与 L3 差距较大, 说明 L1 和 L3 在肠道微生物组成上存在较大差异, 而 L2 的 OTU 数量最多, 这可能是由于 L2 组刀鲚肠道样本选取的重量与 L3 组存在有所差异。

为了研究不同体长组间肠道样本细菌群落结构的相似性或差异关系, 利用 Bray-Curtis 距离算法对门水平上的肠道微生物群落物种进行样本层

级聚类分析, 并构建树状聚类分析图。如图 6 所示, 放线菌门是 L1 组中的优势菌群, 变形菌门是 L2 和 L3 的优势菌群, 且 L1 单独聚为一类, L2 和 L3 聚为一类, 这一结果与胃含物的聚类结果一致, 说明食物组成与肠道菌群组成密切相关。

使用加权(weighted unifrac)距离算法对不同组间肠道菌群进行分析, PCoA 分析表明(图 7), 不同组间肠道菌群出现分离, L1 组单独聚在一起, L2 和 L3 组聚在一起, 说明 L1 与 L2 和 L3 的肠道菌存在较大差异, L2 和 L3 的肠道菌群组成类似, 且通过 ANOSIM 组间差异检验显示不同组间的刀鲚肠道菌群存在差异($P < 0.05$, $R > 0.25$)。

2.6 差异菌群分析

如图 8 所示, 嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和短杆菌属(*Brevibacterium*)在 L1 组富集; 链霉菌属(*Streptomyces*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)在 L2 组富集; *TM7a* 属在 L3 组富集。通过 LDA 判别柱形图可以看出(图 9), 嗜冷杆菌属、活动球菌属(*Planococcaceae*)、短杆菌属和双歧杆菌科(*Brevibacteriaceae*)为 L1 组中的显著性差异菌群, LDA 值均大于 3; 链霉菌属、希瓦氏菌属和经黏液真杆菌属(*Blautia*)为 L2 组中的显著性差异菌群, LDA 值均大于 3; *TM7a* 属为 L3 组中的显著性差异菌群。总体来看, LEfSe 分析和 LDA 判别结果具有一致性, 即嗜冷杆菌属可以作为区分 L1 和

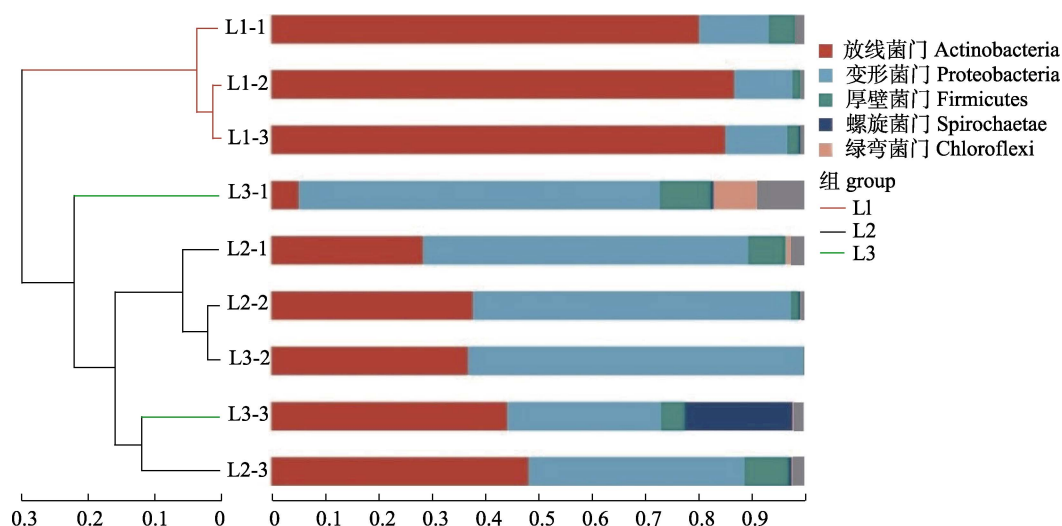


图 6 刀鲚不同体长组肠道菌群的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of gut microbiota of *Coilia nasus* in different body length groups

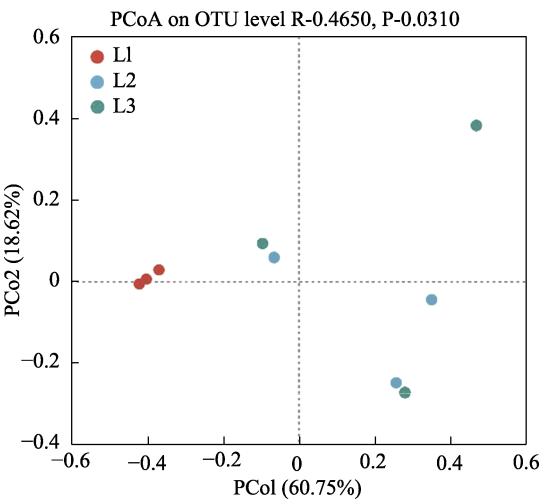


图 7 刀鲚不同体长组肠道菌群 PcoA 分析
Fig. 7 Analysis of PcoA in different body length groups of *Coilia nasus*

其他两个体长组的微生物标记; 链霉菌属和希瓦氏菌属可以作为区分 L2 与其他两个体长组的微生物标记物; *TM7a* 属可以作为区分 L3 与其他两个体长组的微生物标记物。

3 讨论

3.1 刀鲚的食物组成变化与肠道微生物群落多样性密切相关

研究发现刀鲚的食物组成与肠道微生物群落多样性密切相关。以不同体长组刀鲚食物组成的出现频率($F\%$)进行聚类分析的结果与之对应的肠道微生物群落层次聚类一致, 均将 3 个不同体长组聚为两大类, 即 L1 为一类, L2 和 L3 聚为一类, 并在此基础上通过 16S rRNA 测序技术对不同体长组刀鲚肠道微生物群落的多样性和组成进行了初步分析。结果表明, L2 和 L3 组 Shannon 指数高于 L1, 说明随着体长的增加, 刀鲚肠道菌群多样性增高。窦硕增等^[22]、Ma 等^[23]研究发现, 同种鱼类的食物来源会因其生活环境和个体生长发育的变化而变化, 使其肠道微生物群落也随之发生变化; Miyake 等^[24]发现杂食性鱼类褐斑刺虾虎鱼 (*Acanthurus nigrofuscus*) 幼鱼主要的饵料生物为藻类, 而成鱼的主要饵料生物则为浮游动物,

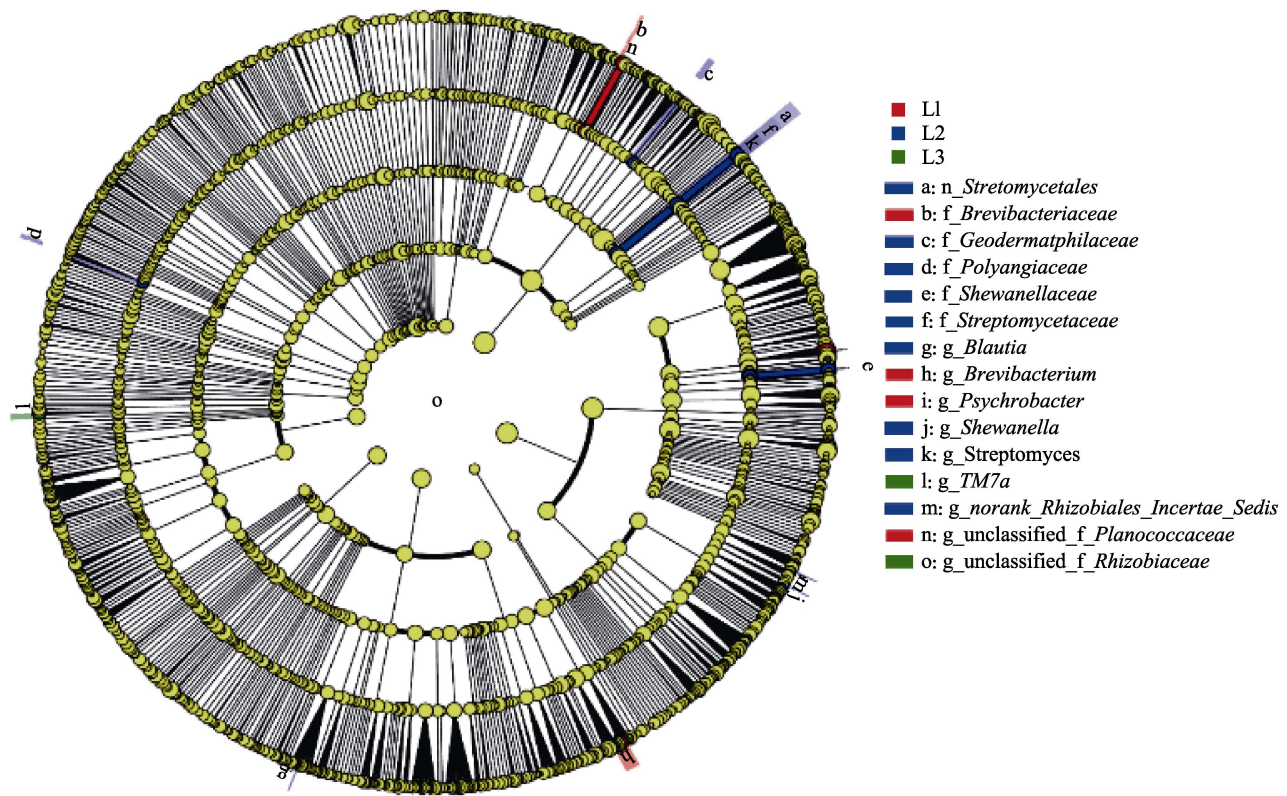


图 8 刀鲚不同体长组肠道菌群 LEfSe 多级物种图
Fig. 8 LEfSe multilevel species map of gut microbiota of *Coilia nasus* in different body length groups

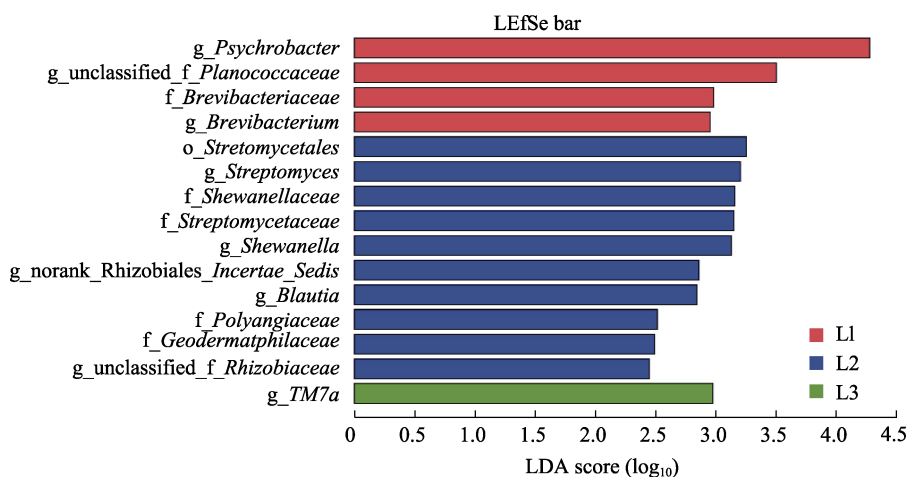


图 9 刀鲚不同体长组肠道菌群 LDA 判别柱形图

Fig. 9 LDA discriminant histogram of gut microbiota in different body length groups of *Coilia nasus*

两者肠道群落结构具有显著变化; Moran 等^[25]对悉尼鲈鱼不同生长发育阶段肠道微生物菌群的研究发现, 肠道微生物群落随宿主食物组成变化而有所差异, 并且食性变化前后肠道微生物多样性也会随之增加。可见随着鱼体的生长和饵料生物的变化, 肠道中微生物菌群为了消化不同种类的食物而增多, 微生物多样性也随之增加。在本研究中, 刀鲚在 L1 (≤ 140 mm)中以桡足类为主要饵料, 随着个体生长发育, L2 和 L3 阶段桡足类出现频率逐渐下降, 刀鲚开始摄食十足类、鱼类和多毛类等饵料生物, 且十足类和线虫类的出现频率逐渐增加, 说明刀鲚随着体长的增长, 其食物组成和饵料丰富度都发生变化, 肠道微生物群落多样性也随之增加, 与 Moran 等^[25]的研究结果相符, 证实了刀鲚的食物组成会因个体生长而变化, 宿主的肠道微生物群落也会随之发生改变。

3.2 刀鲚的摄食习性与肠道微生物群落结构组成密切相关

通过对不同体长组刀鲚肠道菌群群落组成分析, 发现刀鲚肠道微生物群落结构组成会随着其摄食习性的变化而发生改变。有研究表明, 变形菌门和放线菌门是多种鱼类肠道的优势菌群^[26], 如敖梦雪^[27]发现婴幼儿时期长江江豚(*Neophocaena asiaeorientalis*)的优势菌群为变形菌门和放线菌门; 蔡斌斌^[28]发现白甲鱼(*Onychostoma sima*)的优势菌门也为变形菌门和放线菌门等; 常亚娟等^[29]发现长江日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)幼体肠道菌

群主要是变形菌门。本研究结果显示, 刀鲚优势菌门为放线菌门和变形菌门, 这一结果与聂志娟等^[30]对长江刀鲚体内优势菌群研究结果一致; 而浮霉菌门(Planctomycetota)仅存在于大个体刀鲚(L3)肠道中, 与姜敏等^[31]发现南通江段刀鲚(>200 mm)肠道中存在浮霉菌门结果一致。研究表明, 浮霉菌门多存在于厌氧环境下, 并且包含多种厌氧氨氧化菌, 在底泥中相对含量较高^[32], 而刀鲚仔稚鱼和幼鱼一般生活在中上层水域, 以桡足类等小型浮游动物为食; 成鱼栖息于水质较浑浊的底层水域中, 主要以虾类和其他动物的幼体为食^[33], 使得浮霉菌门在肠道中占有一定比例, 进一步证明刀鲚不同发育阶段的摄食习性会影响其肠道微生物群落结构组成。

3.3 刀鲚的生活环境影响肠道微生物群落结构组成

研究表明, 水生生物在不同的生活环境下其肠道微生物的组成存在差异^[34]。本研究中, 在属水平上, 红球菌属是 3 组间共同的优势菌群, 该菌具有积累脂质的功能^[35], 刀鲚洄游主要依靠体内积累的营养物质完成整个洄游生殖, 而脂肪是刀鲚的主要营养素之一^[36]。发光杆菌属在 3 组刀鲚肠道内均存在一定的比例, 有研究发现, 该类菌属在鱼类肠道中可作为共生菌协助几丁质的消化^[37]。螺旋菌门的短螺旋体属(*Brevinema*)仅在 L3 组中被发现, 该类型的菌通常在草食性的鱼类中出现较多^[37]。Duan 等^[38]在太湖刀鲚中发现肠道

菌群以拟杆菌属(*Bacteroides*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)为主。李辰钰等^[39]在长江干流(彭泽段)、鄱阳湖、青草沙水库和嵎泗海域4个水域的刀鲚中发现肠道菌群主要以赫夫勒氏菌属(*Hoeftia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、梭菌属(*Clostridium*)、球杆菌属(*Phocaeicola*)、嗜冷杆菌属、青枯菌属(*Ralstonia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、拟杆菌属、代尔夫特菌属为主。另外,发现嗜冷杆菌属可以作为区分L1和其他两组的微生物标记物,这类菌群已经被归为益生菌类^[37],链霉菌属可以作为区分L2和其他两组的微生物标记物,这类菌群可以诱发水生动物的免疫反应、增强抗菌抗病毒活性、改善胃肠道微菌群以及通过氮固定和有机残基的降解来改善水质^[40],而TM7a属作为区别L3与其他两组的微生物标记物在鱼类肠道中发挥的作用还有待进一步研究,这3种差异菌群可能与刀鲚洄游所经过的水域有关。

参考文献:

- [1] Zhao C L, Chen W J, Zhang Y P, et al. Analysis of biological characteristics and resource status of *Coilia nasus* Schlegel[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology, 2007(2): 21-23. [赵春来, 陈文静, 张燕萍, 等. 刀鲚的生物学特性及资源现状分析[J]. 江西水产科技, 2007(2): 21-23.]
- [2] Guan W B, Chen H H, Ding H T, et al. Reproductive characteristics and conditions of anadromous *Coilia ectenes* (Engraulidae) in Yangtze Estuary[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(1): 73-81. [管卫兵, 陈辉辉, 丁华腾, 等. 长江口刀鲚洄游群体生殖特征和条件状况研究[J]. 海洋渔业, 2010, 32(1): 73-81.]
- [3] Zhang S Y. Fauna sinica-Osteichthyes: Acipenseriformes, Elopiformes, Clupeiformes, Gonorhynchiformes[M]. Beijing: Science Press, 2001: 140-141. [张世义. 中国动物志—硬骨鱼纲: 鲟形目 海鲢目 鲱形目 鼠鲭目[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 140-141.]
- [4] Zhuang P, Zhang T, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary[M]. 2nd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2018: 3-616. [庄平, 张涛, 李圣法, 等. 长江口鱼类[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2018: 3-616.]
- [5] Song C, Li Y G, Zhao F, et al. Reproductive population composition and reproductive performance of *Coilia nasus* from the Yangtze Estuary[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(7): 951-959. [宋超, 李亚鸽, 赵峰, 等. 长江口刀鲚繁殖群体组成及繁殖性能[J]. 中国水产科学, 2022, 29(7): 951-959.]
- [6] 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.
- [7] Izvekova G I, Izvekov E I, Plotnikov A O. Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups[J]. Biology Bulletin, 2007, 34(6): 610-618.
- [8] Sullam K E, Essinger S D, Lozupone C A, et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3363-3378.
- [9] 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.]
- [10] Wang A R, Ran C, Ringo E, et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(3): 626-640.
- [11] Askarian F, Sperstad S, Merrifield D L, et al. The effect of different feeding regimes on enzyme activities of gut microbiota in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. Aquaculture Research, 2013, 44(5): 841-846.
- [12] Liu Y D, Yu K F, Zhu W Y. Impact of macronutrients on gut microbiota[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2016, 24(5): 706-713. [刘艺端, 余凯凡, 朱伟云. 食物主要成分与动物肠道微生物组成及其代谢的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(5): 706-713.]
- [13] Rimmer D W. Changes in diet and the development of microbial digestion in juvenile buffalo bream, *Kyphosus cornellii*[J]. Marine Biology, 1986, 92(3): 443-448.
- [14] Shu Y F, Han M S. Marine Plankton of China Illustrata[M]. Beijing: China Ocean Press, 1993. [束蕴芳, 韩茂森. 中国海洋浮游生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 1993.]
- [15] Ye Z J, Zhu B J, Xue Y. Photographic atlas of fish otoliths of the China Sea[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2007. [叶振江, 朱柏军, 薛莹. 中国习见海洋鱼类耳石图谱[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007.]
- [16] Zhang B, Dai F Q, Jin X S. Morphologic characters of sagittae in some important prey fish in the Yellow Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 917-926. [张波, 戴芳群, 金显仕. 黄海重要饵料鱼种矢耳石的形态特征[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 917-926.]
- [17] Hyslop E J. Stomach contents analysis—A review of methods

- and their application[J]. *Journal of Fish Biology*, 1980, 17(4): 411-429.
- [18] Schafer L N, Platell M E, Valesini F J, et al. Comparisons between the influence of habitat type, season and body size on the dietary compositions of fish species in nearshore marine waters[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 278(1): 67-92.
- [19] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [20] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [21] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [22] Dou S Z, Yang J M. Feeding habit and seasonal variation in food content of *Cynoglossus semilaevis* (Günther) in the Bohai Sea[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1992, 12(4): 368-376. [窦硕增, 杨纪明. 渤海南部半滑舌鳎的食性及摄食的季节性变化[J]. *生态学报*, 1992, 12(4): 368-376.]
- [23] Ma R R, Wang S K, Zhao F, et al. Comparative study on intestinal bacterial communities of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus magnuspinnatus* with different sexes and feeding strategies[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(3): 123-133.
- [24] Miyake S, Ngugi D K, Stingl U. Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(3): 656-672.
- [25] Moran D, Turner S J, Clements K D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus*[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(4): 590-597.
- [26] Roeselers G, Mitte 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.
- [27] Ao M X. A preliminary study on the structure and function of intestinal flora in juvenile Yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2022. [敖梦雪. 婴幼儿时期长江江豚肠道菌群结构与功能的初步研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2022.]
- [28] Cai B B. Diversity and function analysis of the intestine microbes of *Onychostoma sima*[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2017. [蔡斌斌. 白甲鱼肠道微生物多样性及其功能分析[D]. 福州: 福建师范大学, 2017.]
- [29] Chang Y J, Tang W Q, Guo H Y. Study on the intestinal microbial community of *Japanese eel* larvae in the Yangtze River Estuary based on 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(6): 699-710. [常亚娟, 唐文乔, 郭弘艺. 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[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(6): 699-710.]
- [30] Nie Z J, Xu G C, Du F K, et al. PCR-DGGE fingerprinting and diversity analysis of the predominant bacterial community in *Coilia nasus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 1019-1026. [聂志娟, 徐钢春, 杜富宽, 等. 长江刀鲚体内菌群 PCR-DGGE 指纹图谱及多样性比较分析[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(5): 1019-1026.]
- [31] Jiang M, Zhang X Z, Yang Y P, et al. Effects of *Acanthosentis cheni* infection on microbiota composition and diversity in the intestine of *Coilia nasus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 577-585. [姜敏, 张希昭, 杨彦平, 等. 陈氏棘刺虫感染对洄游型刀鲚肠道微生物群落的影响[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 577-585.]
- [32] Woebken D, Lam P, Kuypers M M, et al. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3106-3119.
- [33] Wei G L, Xu G C, Gu R B, et al. Research progress in the biology and artificial breeding of *Coilia nasus*[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2012, 9(7): 31-35. [魏广莲, 徐钢春, 顾若波, 等. 刀鲚的生物学及人工养殖研究进展[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2012, 9(7): 31-35.]
- [34] El Kafsi H, Gorochov G, Larsen M. Host genetics affect microbial ecosystems via host immunity[J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 16(5): 413-420.
- [35] Wu J F, Zhang Y X, Peng R. Research advance in omics, genetic modification, and application of *Rhodococcus*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2022, 28(1): 239-246. [吴金芳, 张雨潇, 彭仁. 红球菌的组学、遗传改造及其应用研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2022, 28(1): 239-246.]
- [36] Xu G C, Bian C, Nie Z J, et al. Genome and population sequencing of a chromosome-level genome assembly of the Chinese tapertail anchovy (*Coilia nasus*) provides novel insights into migratory adaptation[J]. *GigaScience*, 2020, 9(1): giz157.
- [37] Yukgehnaish 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, 12(3): 1903-1927.
- [38] Duan J R, Xu D P, Liu K, et al. Diversity of intestinal microbiota in *Coilia ectenes* from Lake Taihu, China[J].

- Open Life Sciences, 2017, 12(1): 315-325.
- [39] Li C Y, Li L K, Gao X P, et al. Comparative analysis of intestinal flora of *Coilia nasus* and *Coilia brachygnathus* in different waters[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2024: 1-19. [李辰钰, 李乐康, 高小平, 等. 不同水域刀鲚和短颌鲚肠道菌群比较分析[J]. 上海海洋大学学报, 2024: 1-19.]
- [40] Tan L T H, Chan K G, Lee L H, et al. *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: Article No.79.

Study of the gut microbial diversity of *Coilia nasus* in the Yangtze River estuary based on 16S rRNA high-throughput sequencing technology

YANG Guoxiang^{1,2}, LI Dan^{1,3}, YU Wenwen¹, LI Shihu³, SHI Jinjin¹, TANG Jianhua¹, MENG Qian¹, TANG Chengnuo^{1,3}, CEN Yonghua⁴

1. Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China;
2. College of Marine Living Resource Sciences and Management, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
4. Jiangsu Fishery Law Enforcement and Supervision Center, Nantong 226006, China

Abstract: To investigate the variation in gut microbial diversity with food composition in *Coilia nasus*, 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to analyze the gut microbiota diversity of three different body length groups (L1: ≤ 140 mm, L2: 141–200 mm, L3: ≥ 201 mm) of *C. nasus* in the Yangtze River estuary. The analyses showed that copepods and nematodes were the main baiting taxa for *C. nasus* of the different length groups, and the clustering results showed that L1 was clustered into a single group, while L2 and L3 were clustered into a single group. A total of 726 genera and 378 families of microorganisms belonging to 30 phyla were identified in the intestinal samples. At the phylum classification level, the dominant groups of microorganisms in the different groups of *C. nasus* were similar, and were mainly composed of Actinobacteriota and Proteobacteria. Planctomycetota was only found in the intestines of L3 group. *Rhodococcus* was the common dominant genus in the intestines of *C. nasus* of different body lengths, with the highest abundance in group L1 (82.0%) and the lowest in group L3 (27.0%). *Photobacterium* was present at a certain percentage in all three groups. Alpha diversity analysis revealed that the gut microbial diversity of *C. nasus* increased with body length. Clustering analysis using the Bray-Curtis distance algorithm revealed that the clustering results of gut microorganisms among different groups were consistent with the clustering results of the stomach contents analysis. L1 was clustered into one group alone, and L2 and L3 were clustered into one group, which indicated that the composition of the food was closely related to that of the intestinal flora. Principal coordinates analysis showed that the L1 samples were separated from those of the other two groups, while the L2 and L3 samples were clustered together, which indicated that there was a difference in intestinal flora between the three groups. This study revealed that the food composition, feeding habits, and living environment of *C. nasus* were closely related to the composition of the intestinal microflora, which may provide a scientific basis for the conservation and rational development of *C. nasus* resources.

Key words: *Coilia nasus*; food composition; 16S rRNA; intestinal flora; microbial diversity

Corresponding author: YU Wenwen. E-mail: jshyyww@163.com