



# 哈尼梯田稻鲤共作与单养模式下福瑞鲤肠道菌群结构比较研究

聂志娟<sup>1,2</sup>, 徐钢春<sup>2</sup>, 邵乃麟<sup>2</sup>, 王保战<sup>1</sup>, 高建操<sup>2</sup>, 徐跑<sup>2</sup>, 何健<sup>1\*</sup>

1 南京农业大学生命科学学院, 农业农村部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095

2 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214128

聂志娟, 徐钢春, 邵乃麟, 王保战, 高建操, 徐跑, 何健. 哈尼梯田稻鲤共作与单养模式下福瑞鲤肠道菌群结构比较研究. 微生物学报, 2022, 62(4): 1473–1484.

Nie Zhijuan, Xu Gangchun, Shao Nailin, Wang Baozhan, Gao Jiancao, Xu Pao, He Jian. Comparison of gut microbiota in carps from fish monoculture ponds and the rice-fish co-culture system in Hani Terraces. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1473–1484.

**摘要:**【目的】分析不同养殖模式的福瑞鲤肠道菌群结构组成和群落特征。【方法】通过 16S rRNA 高通量测序技术, 分析比较哈尼梯田稻鲤共作、传统池单养、水泥池单养模式下的福瑞鲤肠道菌群的结构组成和丰度差异。【结果】梯田稻鲤组(RCIC)、传统池鲤组(YPIC)和水泥池鲤组(HPIC)分别获得了 2 345、238 和 118 个 OTU。RCIC 组的 Sobs 指数及 PD 指数最高, 显著高于 YPIC 组( $P<0.05$ ), 极其显著高于 HPIC 组( $P<0.01$ ); 池塘单养模式下, 两组之间多样性指数也存在显著差异, YPIC 组大于 HPIC 组( $P<0.05$ )。含量大于 10%优势菌门: RCIC 组主要为变形菌门(39.39%)、梭杆菌门(38.55%)和厚壁菌门(15.4%); YPIC 组为变形菌门(21.87%)、梭杆菌门(58.27%); HPIC 组为变形菌门(46.63%)、梭杆菌门(53.14%)。变形菌和梭杆菌为 3 组福瑞鲤肠道样品的优势菌群, 其中的鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)为核心优势菌属。LEfSe 线性判别分析(LDA>3)显示 17 个具有差异的标记菌属, 其中 *Romboutsia*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Enterobacter*、*Paraclostridium*、*Methylobacterium*、*norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast*、*Edwardsiella*、*Epulopiscium* 为 RCIC 组具有的差异标记菌属。【结论】不同养殖模式的福瑞鲤既有固有菌群, 也

**基金项目:** 国家重点研发计划(2020YFD0900302); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2021ZX05)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900302) and by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021ZX05)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396314; E-mail: hejian@njau.edu.cn

Received: 9 August 2021; Revised: 11 October 2021; Published online: 4 November 2021

塑造差异显著的肠道菌群组成结构。稻梯田鲤肠道菌群丰富度和多样性显著增加，且具有更多的有益差异标记菌属，获得更健康的肠道菌群群落特征。

**关键词：**哈尼梯田；稻-鲤综合种养；菌群结构；肠道；高通量测序

## Comparison of gut microbiota in carps from fish monoculture ponds and the rice-fish co-culture system in Hani Terraces

NIE Zhijuan<sup>1,2</sup>, XU Gangchun<sup>2</sup>, SHAO Nailin<sup>2</sup>, WANG Baozhan<sup>1</sup>, GAO Jiancao<sup>2</sup>, XU Pao<sup>2</sup>, HE Jian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214128, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] This paper aims to analyze the gut microbiota structure of Furuili 2 (*Cyprinus carpio*) from different culture systems. [Methods] The 16S rRNA high-throughput sequencing was performed to analyze the composition and abundance of gut microbiota in Furuili 2 carps from the rice-fish co-culture system in Hani Terraces (RCIC), monoculture system in conventional pond (YPIC), and the monoculture system in cement pond (HPIC). [Results] The high-throughput sequencing yielded 2 345, 238, and 118 operational taxonomic units (OTUs) for the gut microbes in carps from RCIC, YPIC, and HPIC groups, respectively. Sobs and PD indexes in RCIC group were higher than those in YPIC group ( $P<0.05$ ) and HPIC group ( $P<0.01$ ), and the diversity indexes in YPIC group were higher than those in HPIC group ( $P<0.05$ ). The dominant phyla (abundance>10%) were *Proteobacteria* (39.39%), *Fusobacteria* (38.55%), and *Firmicutes* (15.4%) in RCIC group, *Proteobacteria* (21.87%) and *Fusobacteria* (58.27%) in YPIC group, and *Proteobacteria* (46.63%) and *Fusobacteria* (53.14%) in HPIC group. At the genus level, *Cetobacterium* and *Aeromonas* were dominant in all samples. LEfSe analysis (LDA>3) suggested 17 biomarkers, among which 8 were abundant in RCIC group: *Romboutsia*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, *Enterobacter*, *Paraclostridium*, *Methylobacterium*, norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast, *Edwardsiella*, and *Epulopiscium*. [Conclusion] Different culture modes enabled significantly different microbiota structures in carps. In particular, RCIC group boasted higher richness and diversity of gut flora of carps and had more beneficial bacterial markers. As a result, the intestines of carps were healthier.

**Keywords:** Hani Terraces; rice-fish co-culture system; microbial community structure; intestine; high-throughput sequencing

哈尼梯田是世界文化遗产和全球重要的农业文化遗产，逾百万亩宏大规模的农业生态奇观，呈现森林—村寨—梯田—水系“四素同构”的农业生态系统，山区气候，水源丰富，空气

湿润，为生物多样性提供了良好的环境条件，也为稻田养鱼提供得天独厚的优越生态环境<sup>[1]</sup>。稻渔综合种养是在传统稻田养殖基础上发展而来的、成为多物种共栖、多层次配置、多级物质

利用和能量循环的新型复合立体循环现代农业模式<sup>[2]</sup>, 近几年, 在哈尼梯田大力实施推广示范, 实现了精准扶贫, 增加了梯田附加值, 有效缓解了冬闲田、水改旱、抛荒等现象, 有效保护哈尼梯田千年的文化遗产, 实现经济、社会和生态效益三赢<sup>[3]</sup>。

福瑞鲤 2 号, 是以建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)、野生黄河鲤和黑龙江野鲤为原始亲本, 经过连续 5 代选育获得的鲤新品种(GS-01-003-2010)<sup>[4]</sup>。其耐低氧、广温性、广食性、易起捕等优点适合多地区多种养殖方式, 也是云南哈尼梯田稻渔综合种养模式的备受青睐的优良水产品种。鱼类肠道存在着大量的微生物菌群, 超过鱼类细胞数, 被视为一个“额外的器官”<sup>[5]</sup>。研究证明, 正常生理状况下, 肠道微生物与宿主处于一种动态平衡稳定状态, 鱼体内肠道菌群对宿主在吸收营养、促进消化和保护宿主免受病原体侵害方面发挥重要作用<sup>[6-8]</sup>, 其组成受各种内部和外部因素影响, 如宿主种类、生长发育、饵料组成和环境因素等<sup>[9-10]</sup>。肠道菌群目前也是水产领域研究热点, 通过分析鱼类肠道菌群结构上存在的差异及组成特点, 可以获得更有利于鱼类健康生长的肠道微生物信息<sup>[11]</sup>, 进而深入阐明肠道菌群与宿主的互作机制, 对理解鱼类肠道菌群的功能、促进水产养殖业健康发展有着重要意义<sup>[12]</sup>。

稻渔综合种养有助于提高水稻和鱼产品的品质, 福瑞鲤稻花鱼具有比本地鲤和瓯江彩鲤稻花鱼更为优良的脂肪酸营养和肉质风味<sup>[13]</sup>。养殖模式的不同会改变肠道菌群, 进而对宿主免疫力与肌肉品质造成影响<sup>[14]</sup>。本研究对哈尼梯田稻鲤综合种养、传统池与水泥池鲤单养模式下进行鲤肠道菌群多样性高通量测序, 分析福瑞鲤的肠道菌群差异以及不同养殖模式技术下对鲤肠道菌群结构的影响, 为完善和推广

福瑞鲤的稻田养殖模式、保护千年文化遗产, 实现土地的可持续利用提供更科学全面的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鲤为中国水产科学研究院淡水渔业研究中心提供的新品种—福瑞鲤 2 号(*Cyprinus carpio*); 梯田稻鲤样品采集点位于云南省哈尼族彝族自治州红河县(23°17'N, 102°23'E, 海拔 570 m); 室外水泥池鲤样品来源于云南中海渔业有限公司红河县养殖基地(23°19'N, 102°24'E, 海拔 462 m), 面积 1.5 亩, 每亩 3 500 尾鲤; 室外传统池鲤采集于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地(31°27'N, 119°51'E, 海拔 16 m), 面积 2.5 亩, 每亩 2 500 尾鲤。

### 1.2 日常管理

梯田面积 300 m<sup>2</sup>左右, 水稻种植面积为 273 m<sup>2</sup>, 梯田靠内侧养殖沟的面积为 27 m<sup>2</sup>, 外侧种水稻, 养殖沟上宽 1.0 m, 底宽 0.7 m, 深 0.5 m; 水稻为红阳 2 号红米, 于 4 月 28 日按每亩 2.5 万丛, 每丛 2 苗插秧进行移植, 株间距为 20 cm×20 cm。水稻移栽后 30 d (返青后) 按 250 尾/亩量投入 30 g 左右的福瑞鲤, 整个梯田稻鲤综合种养期间不施农药、不投饵且水位始终保持在 5.0–10.0 cm。室外传统池和水泥池福瑞鲤养殖实验期间, 投喂配合饲料, 投喂每天两次, 喂料量为鲤体重的 3%–5%。

### 1.3 样品采集及前处理

梯田鲤实验 3 个月, 于 2019 年 8 月 28 日, 在 3 块实验梯田中, 每块梯田随机抓取 5 条健康、活力强的鲤, 同时采集 5 条同一批次的水泥池养殖的鲤, 分别带回实验室后先用 75% 的乙醇擦拭体表, 在无菌环境下立即解剖采集肠道, 无菌解剖刀刮取肠道内容物。宜兴养殖基

地土池养殖鲤于 2019 年 9 月 10 日按同样的方法和数量进行采集,采集的样品-80 °C 冷冻保存,用于总 DNA 提取。

#### 1.4 样本总 DNA 提取、PCR 扩增及测序

根据 E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil 试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行总 DNA 抽提, DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量;用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序为:95 °C 预变性 3 min,27 个循环(95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s),最后 72 °C 延伸 10 min (PCR 仪:ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700 型)。扩增体系为 20  $\mu$ L,4  $\mu$ L 5 $\times$ FastPfu 缓冲液,2  $\mu$ L 2.5 mol/L dNTPs,0.8  $\mu$ L 引物(5  $\mu$ mol/L),0.4  $\mu$ L FastPfu 聚合酶;10 ng DNA 模板。

使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化回收,2%琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST (Promega, USA)进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台(Illumina, SanDiego, USA)标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2 $\times$ 300 的文库。构建文库步骤:(1) 连接“Y”字形接头;(2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段;(3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;(4) 氢氧化钠变性,产生单链 DNA 片段。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

#### 1.5 数据处理与分析

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控,使用 FLASH 软件进行拼接:(1) 设置 50 bp 的窗口,如果窗口内的平均质量值低于 20,从

窗口前端位置截去该碱基后端所有序列,之后再去除质控后长度低于 50 bp 的序列;(2) 根据重叠碱基 overlap 将两端序列进行拼接,拼接时 overlap 之间的最大错配率为 0.2,长度需大于 10 bp;(3) 根据序列首尾两端的 barcode 和引物将序列拆分至每个样本,barcode 需精确匹配,引物允许 2 个碱基的错配,去除存在模糊碱基的序列。使用 UPARSE 软件,根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用 RDP 对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库(SSU123),设置比对阈值为 70%,后续的多多样性分析在美吉云平台操作完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rRNA 基因高通量测序分析

通过对测序所得的序列进行预处理,去除低质量序列和模糊序列,样本总共获得了 1 763 790 条合格 16S rRNA 基因序列,每个样本产生的有效序列数目为 30 973-74 060,有效序列的平均长度为 416 bp。对所有序列进行 97%相似水平 OTU 划分并物种注释,可划分为 2 451 个 OTU,分类为 45 个门、102 个纲、255 个目、440 个科、832 个属、1 408 个种。

RCIC(梯田稻鲤组)、YPIC(传统池塘鲤组)和 HPIC(水泥塘鲤组)分别产生 2 345、238 和 118 个 OTU(图 1),同时每组特有的 OTU 数 RCIC(2 152)>YPIC(76)>HPIC(27),3 组样品共享 OTU 数为 54 个。此外,RCIC 组和 HPIC 组共享 88 个 OTU,RCIC 组和 YPIC 组共享 OTU 数为 159 个,HPIC 组和 YPIC 组共享 OTU 数为 57 个。试验结果表明,RCIC 组具有的 OTU 数量最多,其特有的 OTU 数量最多,占总 OTU 的 87.8%,而 HPIC 组、YPIC 组特有 OTU 占比分别为 1.10%、3.10%。

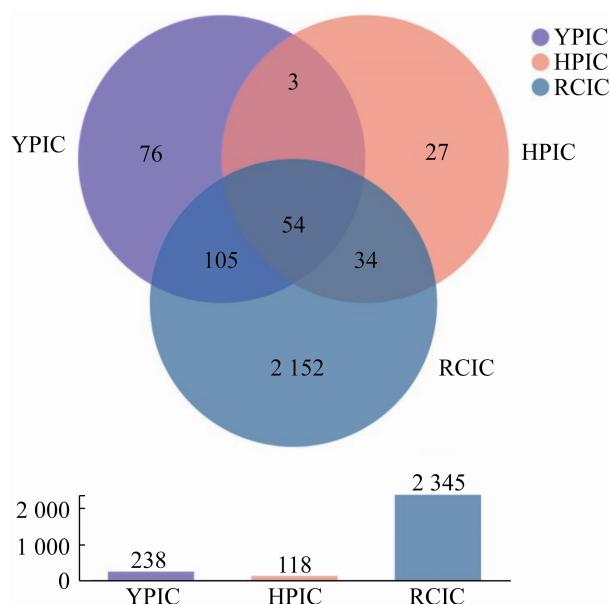


图 1 鲤肠道菌群组成韦恩图

Figure 1 Venn plot of gut bacteria samples of carp. RCIC: terraced rice carp group; YPIC: tradition pond carp group; HPIC: cement pond carp group. Same as below.

## 2.2 菌群多样性分析

如图 2 所示, 梯田稻鲤组(RCIC)的微生物 Sobs 指数及 PD 指数均为最高, 显著高于土池塘鲤组(YPIC) ( $P<0.05$ ), 极其显著高于水泥塘鲤组(HPIC) ( $P<0.01$ )。池塘单养模式下, 两组之间多样性指数也存在显著差异, YPIC 大于 HPIC ( $P<0.05$ ), 说明梯田稻鲤综合种养模式鲤肠道的菌群多样性及丰富度显著高于池塘单养模式; 池塘单养模式中, 土池养殖鲤肠道具有更丰富的菌群。

PCoA 相似矩阵进行分析, 样本菌群组成结构越相似, 样本距离越小越接近。结果如图 3 所示, HPIC 和 YPIC 组的样本组内分别聚得更近, 差异小于不同实验组样本间差异, 表示两组组内重复性好, 组内差异小于组间差异。而 RCIC 组 3 个梯田样品之间分散, 间距较远, 同一梯田样品间距相比较近, 因此, 就鲤不同养

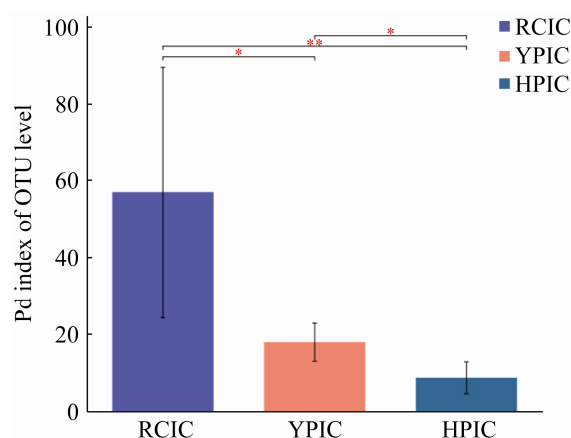


图 2 鲤肠道菌群  $\alpha$  多样性

Figure 2 Diversity index of gut bacteria samples of carp. Notes: \* mean statistically significant differences ( $P<0.05$ ), \*\* mean statistically significant differences ( $P<0.01$ ).

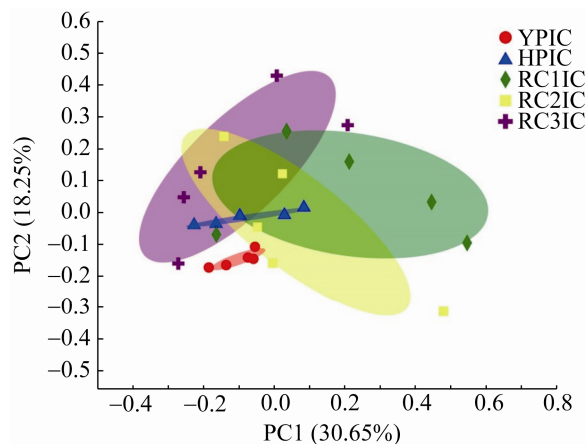


图 3 鲤肠道菌群 PCoA 分析

Figure 3 The PCoA of the intestinal microbiota of carp from pond and rice field. RC1IC: No. 1 terraced rice carp group; RC2IC: No. 2 terraced rice carp group; RC3IC: No. 3 terraced rice carp group; YPIC: tradition pond carp group; HPIC: cement pond carp group.

殖模式而言, 梯田稻鲤组鲤肠道菌群的个体差异更大, 而池塘养殖鲤肠道菌群聚集更集中。

## 2.3 菌群结构组成

稻鲤综合种养和单养模式下福瑞鲤肠道微生物群落中主要含有 5 类菌门(图 4), 为变形菌

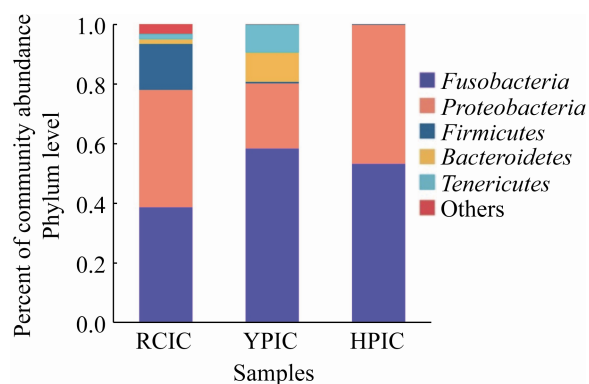


图 4 门水平菌群组成与相对丰度

Figure 4 Relative abundances of the dominant microbiota phyla.

门(*Proteobacteria*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和柔膜菌门(*Tenericutes*)。5 类菌门在稻鲤综合种养模式下丰度分别为：39.39%、38.55%、15.40%、1.56%、1.80%；传统池单养模式下分别为：21.87%、58.27%、0.51%、9.80%、9.41%；水泥池单养模式下分别为：46.63%、53.14%、0.20%、0.01%、0.00%。按占 10%以上为优势菌门统计，稻鲤综合种养模式下福瑞鲤肠道为变形菌门、梭杆菌门和厚壁菌门；传统池单养模式下为变形菌门、梭杆菌门；水泥池单养模式下变形菌门、梭杆菌门。在不同养殖模式下，变形菌和梭杆菌都是福瑞鲤肠道的优势菌门，而厚壁菌仅为稻梯田鲤组的优势菌门。

不同养殖模式福瑞鲤肠道样本微生物属水平群落组成 Heatmap 图和样本聚类树分析(图 5)。传统土池和水泥池单养模式下样品聚为一支，说明两种单养模式福瑞鲤肠道菌属组成更为相似。Heatmap 图展示的为丰度排名前 50 菌属，图中色块颜色代表某一个属相对丰度的大小，颜色越红代表相对丰度越高。根据红色的深浅变化，可以得出鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)是福

瑞鲤肠道丰度最高的细菌类群，为其核心菌属，并且相互聚合在一起。此外，在 YPIC 组福瑞鲤肠道样品含有 *norank\_f\_Mycoplasmataceae*、*norank\_f\_Barnesiellaceae*、*Macellibacteroides*、*norank\_f\_Desulfovibrionaceae* 等丰度相对较高的菌属；*Romboutsia*、*norank\_f\_Mycoplasmataceae*、*norank\_f\_Desulfovibrionaceae*、*unclassified\_f\_Vibrionaceae*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Haematospirillum*、*Paraclostridium*、*Brevinema*、*Candidatus\_Paenicardinium* 等菌属在 RCIC 组福瑞鲤肠道样品也有较高含量。根据颜色变化可知，RCIC 组细菌种群在属水平上的丰度与其他两组差异较大。

## 2.4 菌群结构差异分析

通过对不同养殖模式福瑞鲤肠道组样本使用非参数因子克鲁斯卡尔—沃利斯秩和检验，进行 LEfSe 分析，检测具有显著丰度差异特征菌群。结果显示(图 6)，从里到外为从门到属 LDA score>2 阈值进行分析，图中红蓝色圆圈标注显示 3 组差异特征菌数量多，其中 RCIC 组显著丰度差异特征菌有酸杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、疣微菌门、绿弯菌门、蓝藻门、髌骨细菌门(*Patescibacteria*)，而 YPIC 组只有拟杆菌门和柔膜菌门有显著丰度差异特征菌群。优选 LDA score>3 的 biomarker 菌属共有 17 个，由图 7 可知，*norank\_f\_Barnesiellaceae*、*Macellibacteroides*、*Paludibacter*、*unclassified\_o\_Bacteroidales*、*Acetobacteroides*、*ZOR0006* 在 YPIC 组中起着重要作用，*Plesiomonas*、*unclassified\_f\_Enterobacteriaceae*、*Escherichia*、*Shigella* 在 HPIC 组中起着重要作用，而在 RCIC 组中 *Romboutsia*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Enterobacter*、*Paraclostridium*、*Methylobacterium*、*norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast*、*Edwardsiella*、*Epulopiscium* 起着重要作用。数据分析表明，

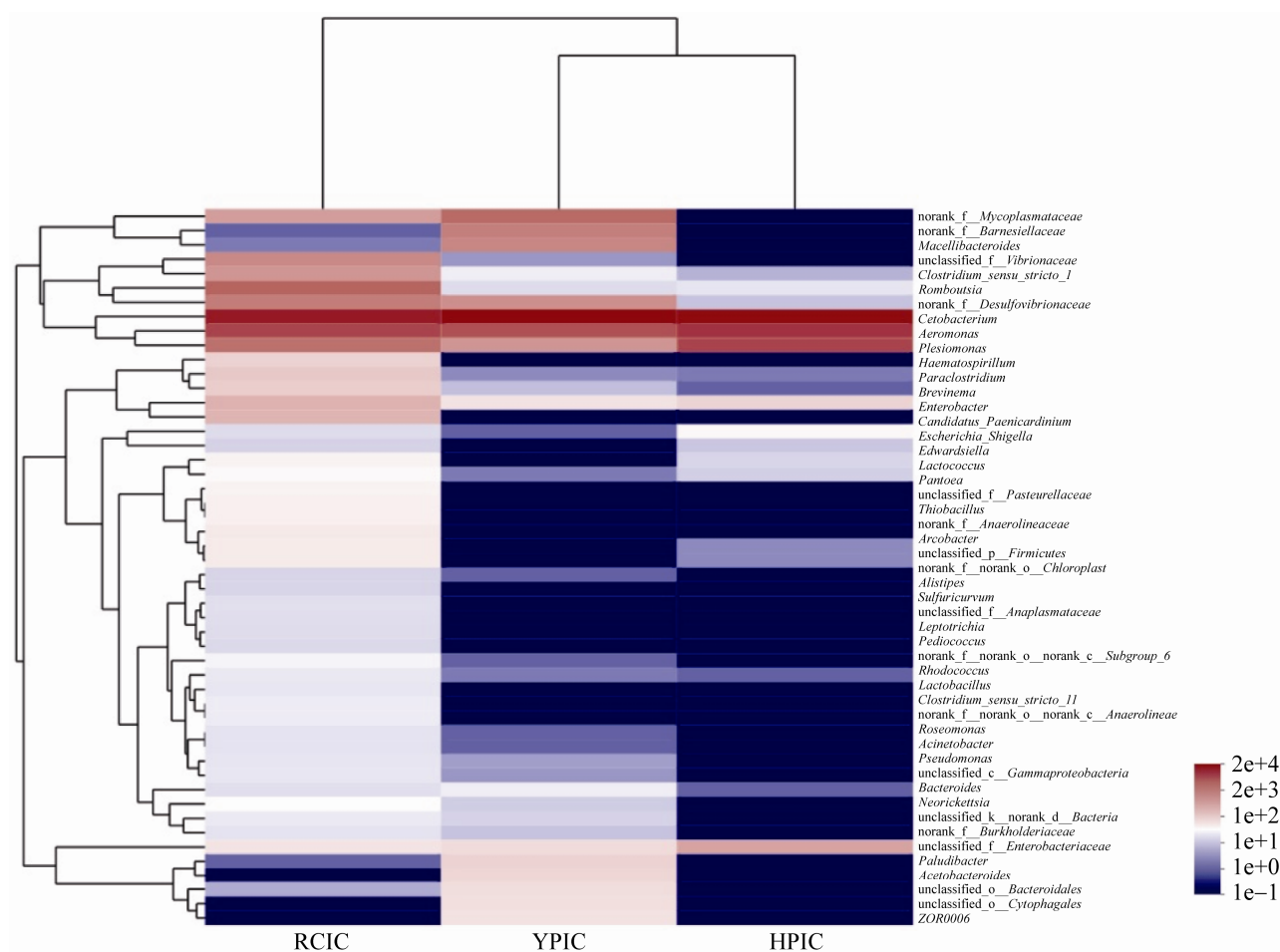


图5 属水平群落组成 heatmap 图

Figure 5 Relative abundances of the dominant microbiota genus.

不同的养殖模式改变了福瑞鲤肠道微生物组成，且稻鲤综合种养福瑞鲤肠道差异菌群数量要显著高于福瑞鲤单养模式。

### 3 讨论

哈尼梯田“一山分四季，十里不同天”，“山有多高，水有多高”的特殊地理气候，呈现森林—村寨—梯田—水系“四素同构”的农业生态系统，为生物多样性提供了良好的环境条件，为稻田养鱼提供得天独厚的优越生态环境。研究发现，全程不投饲料稻渔综合种养梯田里，土壤表面菌群多样性显著增高而肥力指标均降低，其中

含水率、pH、总磷和速效磷显著降低；与单稻种植比较，不同生态位综合种养体系的构建加快了梯田系统各种物质的吸收代谢<sup>[15]</sup>。越来越多的试验和观察研究表明，微生物多样性在生态系统中养分循环、有机质降解、生产力和病原菌调控等方面具有重要作用<sup>[16]</sup>。本研究分析得出，哈尼梯稻田福瑞鲤肠道菌群多样性远远高于土池、水泥池福瑞鲤，这与比较稻田和池塘养殖金边鲤和建鲤的研究结果一致<sup>[17]</sup>，肠道内丰富的微生物菌群在宿主体内的各种生理生化反应中发挥着重要作用，帮助宿主应对外界环境<sup>[18]</sup>。



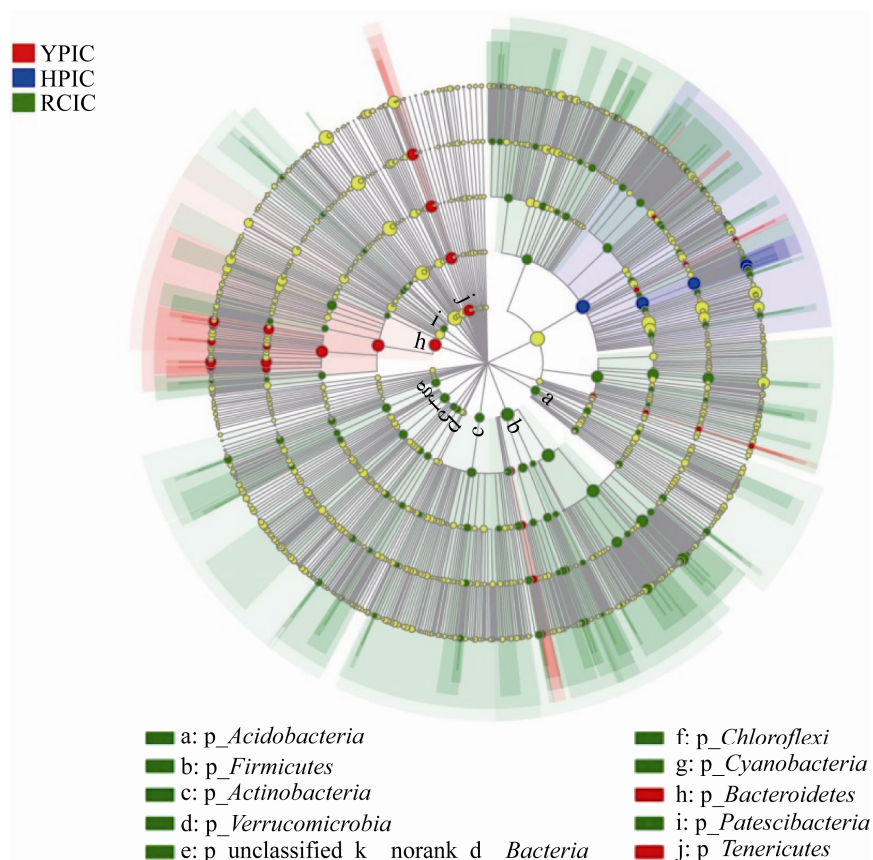


图 6 LEfSe 多级物种层级树图(LDA>2)

Figure 6 LEfSe multilevel species hierarchy tree diagram with LDA values higher than 2. The clustering tree, red, blue and green nodes representing that play an important role in the bacterial groups respectively, and yellow nodes representing the bacterial groups that do not play an important role in the three groups. The names of the bacteria are shown at the bottom of diagram. Differences are represented in the color of the most abundant class (Red indicates the earth pond carp group, Blue indicates the outdoor cement pond carp group, and green indicates terraced rice carp group). Each circle's diameter is proportional to the taxon's abundance. Circles represent phylogenetic levels from phylum to genus inside out. Labels are shown of the phylum levels.

本文通过高通量测序分析了 3 种不同养殖模式福瑞鲤肠道微生物区系, 揭示了福瑞鲤肠道微生物的种类和结构组成, 得出在门水平上, 变形菌和梭杆菌是不同养殖模式养殖鲤最丰富的肠道菌群, 而厚壁菌门也被检测为优势菌, 但仅仅在哈尼稻梯田鲤组中, 所占比为 15.40%。这与之前的研究类似, 变形菌和厚壁菌都为梯田福瑞鲤的优势菌群, 同时, 之前的研究结果显示厚壁菌含量高达 58.59%<sup>[15]</sup>, 明显高于此次

试验结果; 两个试验点虽都有哈尼梯田, 但之前的研究是海拔 1 752.6 m, 本研究是海拔 570 m, 其海拔差造成的温度气压等环境条件变化, 直接影响了福瑞鲤梯田系统的生长环境, 间接影响着福瑞鲤肠道菌群结构组成。厚壁菌能够降解多种多糖<sup>[19]</sup>, 其多糖发酵效率也高<sup>[20-21]</sup>。饶刘瑜等<sup>[22]</sup>研究得出转基因鲤相比对照鲤肠道中存在更多的厚壁菌门细菌, 其与转基因鲤碳水化合物代谢存在显著的正相关性。Tan 等<sup>[23]</sup>研究吉



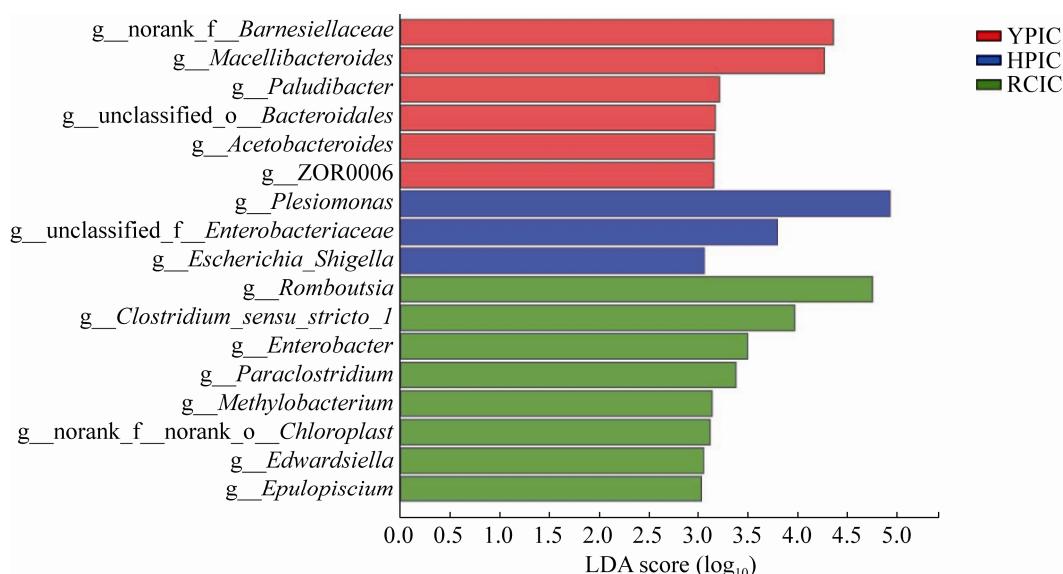


图 7 LDA 判别柱形图(LDA>3)

Figure 7 LDA discriminant histogram with LDA values higher than 3.

罗鱼肠道菌群发现野生吉罗鱼含有更为丰富的厚壁菌门, 并解释野生吉罗鱼摄食栖息地大量的水生植物、浮游藻类等植物, 这些植物的细胞壁是由多糖组成的。鲸杆菌属属于梭杆菌门, 是福瑞鲤肠道丰度最高的菌属, 在稻田综合种养和单养模式下含量 38%–58%, 表明它是福瑞鲤肠道的核心菌, 这与其他鲤研究结果相同<sup>[24]</sup>。该菌在罗非鱼、斑马鱼、虹鳟、斑点鲶鱼、大口黑鲈和蓝鳃鱼的肠道中也很常见<sup>[25–28]</sup>。在历经 3 年人工养殖的吉罗鱼中, 该菌仍一直定居其肠道体内, 这表明其在鱼肠道中发挥重要的作用和功能<sup>[23]</sup>。Borsodi 等研究发现厌氧鲸杆菌能有效促进有机质、浮游动植物消化分解<sup>[29]</sup>。也有报道称, 鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)参与细菌介导的钴胺素生物合成<sup>[30]</sup>。鲸杆菌有益, 但其生长需要严格厌氧的环境, 在正常大气条件下不易存活, 大大阻碍了该菌作为益生菌在水产养殖业的开发应用。

LEfSe 差异分析显示, 样品间具有显著丰

度差异特征菌群, 表明地理距离的差异<sup>[31]</sup>、不同的食物源<sup>[32]</sup>、不同的养殖模式<sup>[17]</sup>等会形成物种特异性的肠道菌群, 实验数据与我们的推测相一致, 即环境会影响宿主肠道菌群的多样性和群落结构。鲤属于杂食性, 食物的来源取决于生长环境中能获取什么样的食物<sup>[33]</sup>, 相比于主要摄食饲料的池塘养殖(土池和水泥池), 稻梯田养殖饮食结构更为复杂, 食物来源丰富, 因其为人放天养, 全程是不投入任何人工饲料, 主要摄食水中浮游动植物和大型底栖生物等。*Romboutsia*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Enterobacter*、*Paraclostridium*、*Methylobacterium*、*norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast*、*Edwardsiella*、*Epulumiscium* 为稻梯田组的显著差异标记菌属。其中含量最高的是 *Romboutsia* (11.44%), 其最近发现于肠道样品中, 在维持宿主健康方面发挥着关键作用, 是一类非常有价值的肠道益生菌<sup>[34–35]</sup>。Mangifesta 等<sup>[36]</sup>比较得出 *Romboutsia* 在健康粘膜中更为丰富, 在结直肠癌组织中的相对丰度大大降低, 这种微生物属的缺失被认

为是粘膜改变的一个重要指标,也已经被观察到与其他肠道相关疾病有关<sup>[37-38]</sup>。梭状芽胞杆菌 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 差异标记菌属在稻梯田组鲤肠道中含量为 2.28%, 超过 1%, 为优势菌属。早期的研究报道, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 的肠道定殖通过 CD41 提高 T 细胞的聚集调控<sup>[39]</sup>, 并通过阻碍致病性微生物群的定殖来增强婴儿肠道细菌的耐药性<sup>[40]</sup>。王艳芳<sup>[41]</sup>得出 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 相对丰度与短链脂肪酸(SCFAs)含量呈正相关,可促进 SCFAs 的产生,改善肠道微生物组成。

本试验通过分析比较哈尼梯田稻鲤共作、传统池鲤单养、水泥池鲤单养 3 组不同养殖模式的福瑞鲤肠道菌群的结构组成和丰度差异。不同的养殖模式的福瑞鲤既有固有菌群,也产生差异显著的肠道菌群组成结构。相比于单养模式,哈尼梯田稻鲤共作模式是水稻种植和鱼养殖同时进行,该模式下鲤肠道形成更加丰富多样的菌群结构使福瑞鲤更能适应复杂多变的哈尼梯田环境,同时鲤鱼能为水稻除草、除虫、疏土,实现稻鱼互利双赢。菌群、宿主与环境之间,始终处于动态平衡状态中,形成一个互相依存,相互制约的系统,哈尼稻梯田鲤肠道具有的有益标记菌群是否能够在鲤肠道长期定殖转换成固有菌群,则需要进一步深入研究探讨。

## 参考文献

- [1] 舒远琴, 宋维峰, 马建刚. 哈尼梯田湿地生态系统健康评价指标体系构建. 生态学报, 2021, 41(23): 1-13. Shu YQ, Song WF, Ma JG. Establishment of health evaluation index system of Hani Terrance wetland ecosystem. Acta Ecologica Sinica 2021, 41(23): 1-13. (in Chinese)
- [2] 孙刚, 房岩, 韩德复. 复合种养水田生态系统的综合效益. 农业与技术, 2006, 26(5): 48-50. Sun G, Fang Y, Han DF. Comprehensive profits of integrated farming rice field ecosystem. Agriculture & Technology, 2006, 26(5): 48-50. (in Chinese)
- [3] 蒋哲姝, 陈红磊, 蒋高中. 世界文化遗产的可持续保护与精准扶贫有机结合的成功实践——以云南红河哈尼梯田“稻渔共作”养殖模式为例. 中国农学通报, 2018, 34(23): 160-164. Jiang ZS, Chen HL, Jiang GZ. Combinative practice of sustainable protection of world cultural heritage and targeted poverty alleviation: a case study of “rice-fish culture” mode in Hani terraced fields of Honghe, Yunnan. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(23): 160-164. (in Chinese)
- [4] 王兰梅, 朱文彬, 傅建军, 董在杰. 福瑞鲤 2 号不同生长速率个体肌肉组织转录组分析. 水产学报, 2021, 45(1): 79-87. Wang LM, Zhu WB, Fu JJ, Dong ZJ. De novo transcriptome analysis and comparison of the FFRC No. 2 strain common carp (*Cyprinus carpio*) associated with its muscle growth. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(1): 79-87. (in Chinese)
- [5] O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Reports, 2006, 7(7): 688-693.
- [6] Kaktcham PM, Temgoua JB, Ngoufack Zambou F, Diaz-Ruiz G, Wachter C, Pérez-Chabela MDL. Quantitative analyses of the bacterial microbiota of rearing environment, tilapia and common carp cultured in earthen ponds and inhibitory activity of its lactic acid bacteria on fish spoilage and pathogenic bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(2): 1-12.
- [7] Jutfelt F, Olsen RE, Björnsson BT, Sundell K. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon. Aquaculture, 2007, 273(2/3): 298-311.
- [8] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(3): 141-153.
- [9] Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight R, Kilham SS, Russell JA. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3363-3378.
- [10] Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, Wadsworth S, Romero J, Kroghdahl Å, Olsen RE, Dimitroglou A, Foey A, Davies S, Owen M, Lauzon HL, Martinsen LL, De Schryver P, Bossier P, Sperstad S, Merrifield DL. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? Aquaculture Nutrition, 2016, 22(2): 219-282.

- [11] Pérez T, Alba C, Aparicio M, de Andrés J, Ruiz Santa Quiteria JA, Rodríguez JM, Gibello A. Abundant bacteria in the proximal and distal intestine of healthy Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*). *Aquaculture*, 2019, 506: 325–336.
- [12] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展. *水产学报*, 2019, 43(1): 143–155.  
Meng XL, Li WJ, Nie GX. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 143–155. (in Chinese)
- [13] 樊海平, 薛凌展, 秦志清, 钟全福, 郑磊, 杨晓燕, 黄德荣, 张树兴. 不同品种稻花鲤肌肉中脂肪酸组成比较分析. *中国农学通报*, 2019, 35(31): 139–143.  
Fan HP, Xue LZ, Qin ZQ, Zhong QF, Zheng L, Yang XY, Huang DR, Zhang SX. Muscle fatty acid composition of paddy field carp varieties: a comparison. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(31): 139–143. (in Chinese)
- [14] 赵柳兰, 龙亚男, 罗杰, 刘巧, 周剑, 杜军, 周亚, 杨佰维, 杨淞. 池塘和稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群、免疫酶活性及肌肉氨基酸比较分析. *中国水产科学*, 2021, 28(1): 48–56.  
Zhao LL, Long YN, Luo J, Liu Q, Zhou J, Du J, Zhou Y, Yang BW, Yang S. Analysis and comparison of intestinal microbiota, immune enzyme activities, and muscle flavor of Jian carp in two culture modes. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(1): 48–56. (in Chinese)
- [15] 聂志娟, 李非凡, 赵文武, 徐钢春, 刘波, 王裕玉, 邵乃麟, 胡佳雯, 徐跑. 哈尼梯田稻鲤共作模式下的微生物群落结构. *水产学报*, 2020, 44(3): 469–479.  
Nie ZJ, Li FF, Zhao WW, Xu GC, Liu B, Wang YY, Shao NL, Hu JW, Xu P. Microbial community structure of the rice-carp co-culture systems in Hani Terraces. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 469–479. (in Chinese)
- [16] Fan KK, Delgado-Baquerizo M, Guo XS, Wang DZ, Zhu YG, Chu HY. Biodiversity of key-stone phylotypes determines crop production in a 4-decade fertilization experiment. *The ISME Journal*, 2021, 15(2): 550–561.
- [17] 严雪瑜, 叶香尘, 韦玲静, 文衍红, 杨著山, 滕忠作, 刘康, 吕业坚. 稻田和池塘两种模式下金边鲤与建鲤肠道菌群差异分析. *水产科学*, 2020, 39(4): 509–516.  
Yan XY, Ye XC, Wei LJ, Wen YH, Yang ZS, Teng ZZ, Liu K, Lyu YJ. Analysis of difference in intestinal bacterial flora between common carp *Cyprinus carpio* var. *jinbian* and *C. carpio* var. *jian* cultured in paddy fields and in ponds. *Fisheries Science*, 2020, 39(4): 509–516. (in Chinese)
- [18] Luo ZW, Dong ZX, Chen YF, Li HY, Tang QH, Li JL, Guo J. Comparative analysis of the gut microbiota of *Apis cerana* in Yunnan using high-throughput sequencing. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(9): 2557–2567.
- [19] Cockburn DW, Koropatkin NM. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(16): 3230–3252.
- [20] Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*, 2004, 101(44): 15718–15723.
- [21] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [22] 饶刘瑜, 李学梅, 李星浩, 朱文根, 余育和, 颜庆云. 转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 349–355.  
Rao LY, Li XM, Li XH, Zhu WG, Yu YH, Yan QY. Comparison between the intestinal bacterial communities of the transgenic common carp and the controls. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 349–355. (in Chinese)
- [23] Tan CK, Natrah I, Suyub IB, Edward MJ, Kaman N, Samsudin AA. Comparative study of gut microbiota in wild and captive Malaysian Mahseer (*Tor tambroides*). *Microbiology Open*, 2019, 8(5): e00734.
- [24] Van Kessel MA, Dutilh BE, Neveling K, Kwint MP, Veltman JA, Flik G, Jetten MS, Klaren PH, Op den Camp HJ. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, 2011, 1(1): 1–9.
- [25] Adeoye AA, Yomla R, Jaramillo-Torres A, Rodiles A, Merrifield DL, Davies SJ. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, 2016, 463: 61–70.
- [26] Etyemez M, Balcázar JL. Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Research in Veterinary Science*, 2015, 100: 8–11.
- [27] Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR.

- Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(6): 1396–1404.
- [28] Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal*, 2011, 5(10): 1595–1608.
- [29] Borsodi AK, Szabó A, Krett G, Felföldi T, Specziár A, Boros G. Gut content microbiota of introduced bigheaded carps (*Hypophthalmichthys* spp.) inhabiting the largest shallow lake in Central Europe. *Microbiological Research*, 2017, 195: 40–50.
- [30] Koo H, Hakim JA, Powell ML, Kumar R, Eipers PG, Morrow CD, Crowley M, Lefkowitz EJ, Watts SA, Bej AK. Metagenomics approach to the study of the gut microbiome structure and function in zebrafish *Danio rerio* fed with gluten formulated diet. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 135: 69–76.
- [31] Koch H, Schmid-Hempel P. Bacterial communities in central European bumblebees: low diversity and high specificity. *Microbial Ecology*, 2011, 62(1): 121–133.
- [32] Rothman JA, Carroll MJ, Meikle WG, Anderson KE, McFrederick QS. Longitudinal effects of supplemental forage on the honey bee (*Apis mellifera*) microbiota and inter- and intra-colony variability. *Microbial Ecology*, 2018, 76(3): 814–824.
- [33] 李传红. 鱼类对热带浅水湖泊的影响及其在湖泊修复中的意义. 暨南大学博士学位论文, 2008.
- [34] Gerritsen J, Fuentes S, Grievink W, Van Niftrik L, Tindall BJ, Timmerman HM, Rijkers GT, Smidt H. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt\_5): 1600–1616.
- [35] Jacoline G, Bastian H, Bernadette R, Sacha AFT, Vitor MDS, Rijkers GT, Schaap PJ, Willem MDV, Hauke S. Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIBT reveals adaptation to the small intestine. *PeerJ*, 2017: 5.
- [36] Mangifesta M, Mancabelli L, Milani C, Gaiani F, De'Angelis N, De'Angelis GL, Sinderen D, Ventura M, Turroni F. Mucosal microbiota of intestinal polyps reveals putative biomarkers of colorectal cancer. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–9.
- [37] Ricaboni D, Mailhe M, Khelaifia S, Raoult D, Million M. *Romboutsia timonensis*, a new species isolated from human gut. *New Microbes and New Infections*, 2016, 12: 6–7.
- [38] Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, Nouvenne A, Lugli GA, Mancabelli L, Turroni F, Duranti S, Mangifesta M, Viappiani A, Ferrario C, Maggio M, Lauretani F, De Vos W, van Sinderen D, Meschi T, Ventura M. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25945.
- [39] Liu BS, Zhu XY, Cui YL, Wang WJ, Liu H, Li ZD, Guo ZG, Ma S, Li DF, Wang CZ, Shi YH. Consumption of dietary fiber from different sources during pregnancy alters sow gut microbiota and improves performance and reduces inflammation in sows and piglets. *mSystems*, 2021, 6(1): e00591-20.
- [40] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(1): 1–8.
- [41] 王艳芳. 滇黄精多糖改善大鼠脂代谢紊乱的作用研究. 云南中医学院硕士学位论文, 2017.

(本文责编 张晓丽)