

珠江口野生棘线鲷胃肠道微生物多样性

崔林青^{1,2,3}, 曾琦^{1,2,3}, 石松标^{1,2,3}, 张坤^{1,2,3}, 黄文静⁴, 田新朋^{*1,2}

1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301

2 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 广东海洋大学, 广东 湛江 524088

崔林青, 曾琦, 石松标, 张坤, 黄文静, 田新朋. 珠江口野生棘线鲷胃肠道微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4567-4585

Cui Linqing, Zeng Qi, Shi Songbiao, Zhang Kun, Huang Wenjing, Tian Xinpeng. Microbial diversity in gastrointestinal tract of wild *Grammoplites scaber* collected from the Pearl River Estuary[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4567-4585

摘要:【背景】野生棘线鲷(*Grammoplites scaber*)具有丰富的营养价值,但关于其胃肠道微生物方面的研究较少。【目的】研究棘线鲷胃肠道微生物群落特征,以揭示其潜在的益生菌和致病菌,为其健康生长的微生物群落调控提供依据。【方法】利用免培养和纯培养技术相结合的方式对来自珠江口的野生棘线鲷胃肠道样品进行了研究。【结果】通过对16S rRNA基因V3区高通量扩增测序,共得到456个操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)。分析结果显示,在门水平上,棘线鲷胃肠道内的主要优势类群为变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。在属级水平上,梭菌属(*Clostridium*)在棘线鲷胃肠道样品中普遍存在,综合占比为57.11%。基于16S rRNA基因进行表型和功能预测的结果表明,棘线鲷胃肠道内有益菌和潜在致病菌同时存在且有功能相互制约的趋势。纯培养实验采用12种不同的培养基进行选择分离,共获得纯培养菌株99株,归类于3个门(*Proteobacteria*、*Firmicutes*和*Actinobacteria*)4个纲10个目10个科13个属,其中优势类群为变形菌门(占比50.51%),实现纯培养最多的属级类群为嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)。【结论】揭示了野生棘线鲷胃肠道微环境微生物的物种组成与多样性,可以为硬骨鱼类核心肠道菌群的研究提供基础参考。此外,有益和有害菌群的揭示可为野生棘线鲷作为海洋食物资源利用的食品安全提供一定的借鉴,为发展海洋渔业养殖提供数据支撑。

关键词: 棘线鲷; 肠道微生物; 高通量测序; 微生物多样性; 纯培养

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)

Supported by: Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0402)

*Corresponding author: E-mail: xinpengtian@scsio.ac.cn

Received: 2022-01-27; Accepted: 2022-04-29; Published online: 2022-08-05

Microbial diversity in gastrointestinal tract of wild *Grammoplites scaber* collected from the Pearl River Estuary

CUI Linqing^{1,2,3}, ZENG Qi^{1,2,3}, SHI Songbiao^{1,2,3}, ZHANG Kun^{1,2,3}, HUANG Wenjing⁴, TIAN Xinpeng^{*1,2}

1 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

2 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, Guangdong, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China

Abstract: [Background] Wild *Grammoplites scaber* is nutritious, but the microorganisms in its gastrointestinal tract (GI) are rarely studied. [Objective] To study the microbial community in GI of *G. scaber*, reveal the potential probiotics and pathogens, and thus to provide a reference for the regulation of beneficial microbes. [Methods] We collected the GI samples of *G. scaber* from the Pearl River Estuary and investigated them with the culture-independent method and pure culture method. [Results] Through high-throughput sequencing of V3 regions of 16S rRNA genes, a total of 456 operational taxonomic units (OTUs) were identified. At the phylum level, *Proteobacteria* and *Firmicutes* dominated the microbes in the GI. At the genus level, *Clostridium* was prevalent in the samples, accounting for 57.11%. The 16S rRNA gene-based phenotypic and functional prediction suggested that the GI of *G. scaber* harbored both probiotics and pathogens, and they tended to restrict each other. A total of 99 strains were screened out with 12 different selective media, and they belong to 13 genera, 10 families, 10 orders, 4 classes, and 3 phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*). The dominant group was *Proteobacteria* (50.51%), and *Psychrobacter* was the predominant genus. [Conclusion] This study reveals the microbial composition and diversity in the GI of wild *G. scaber*, laying a basis for the research on the core intestinal microflora of teleost. In addition, the probiotics and pathogens identified in this study can serve as a reference for the safety of food made with *G. scaber* and for the development of marine fishery.

Keywords: *Grammoplites scaber*; intestinal microbiota; high-throughput sequencing; microbial diversity; pure culture

脊椎动物胃肠道微生物生态系统中存在着复杂但却相对稳定的微生物与微生物、宿主之间的相互关系^[1]。肠道微生物具有产生某些有益代谢产物或胞外酶的能力, 可为宿主提供多种实质性的益处。例如, 微生物通过产生纤维素酶分解一些宿主难以消化的植物性食物, 从而为宿主提供能量^[2]。此外, 也有研究表明, 宿主的许多过敏反应、自身免疫性和代谢性疾病都与肠道微生态系统的变化有关^[1,3-4]。目

前, 我们对胃肠道微生物组结构和功能的大部分知识源自对哺乳动物的研究, 但鱼类占据了脊椎动物近一半的多样性^[5], 因此, 对鱼类胃肠道微生物组的研究和利用也日益重要。

物种对环境变化的适应, 一部分原因依赖于宿主相关的微生物群落^[6], 同时, 肠道内的细菌群落也会随着宿主环境的变化而改变并趋于稳定^[5]。例如, 从大西洋鲑鱼(*Atlantic salmon*)^[7]和大西洋鳕鱼(*Atlantic cod*)^[8]肠道内分别分离出

具有产纤维素酶功能的 *Bacillus* 和 *Brochothrix* 等属种, 推测它们在以小型鱼虾为食的基础上, 还可能摄食某些植物性食物。相较于海水鱼类的肠道微生物群落, 在淡水鱼肠道中梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 更具优势。如 Lai 等研究发现, 在养殖青鲮鱼从海水向淡水驯化过程中, 当养殖海水盐度降低 50% 后青鲮鱼肠道中梭杆菌门的丰度显著增加, 以应对宿主环境的变化^[9]。然而与哺乳动物肠道微生物相较而言, 鱼类肠道微生物群落特征与植物根际微生物群落更相似, 主要表现在变形菌门的占比优势上^[10]。随着高通量测序技术的发展, 人们对鱼类肠道微生物群落在不同生理状态下的变化有了逐渐全面的了解, 特别是将鱼类肠道微生物群落的组成与不同生长因素(包括饮食^[11]、生活环境^[12]、肠道分区^[13]等)相关联的研究, 更有利于人们利用肠道菌群来判断和改善宿主的健康状态。

棘线鲷 (*Grammoplites scaber*) 又称横带棘线牛尾鱼, 头部和身体呈扁平状, 体褐色, 背侧具 4 条黑褐色宽大横纹。棘线鲷为鲷形目牛尾鱼科棘线鲷属的一种白肉鱼类, 栖息于沿岸沙泥底质海域, 活动性差, 以小鱼和甲壳类为食^[14], 广泛分布于印度、南洋群岛及中国南海、中国台湾海峡等海域, 属于热带近海底层鱼类。棘线鲷虽具有高营养和蛋白质含量, 但因其外形独特和鱼腥味较重, 作为食用鱼类极易被人类忽视^[15], 导致人们对棘线鲷的研究也较少, 缺乏对其胃肠道微生物组成的详细研究和记载。广东省珠江口万山海洋牧场沉积物质量良好, 地形较缓, 底层相对稳定, 适合投放人工鱼礁建造海洋牧场^[16], 而且是棘线鲷分布的重要海域。本文利用高通量测序和实验室纯培养技术研究野生棘线鲷胃肠道微生物的组成情况, 探究其胃肠道微生物群落的构成, 以期在发现新微生物资源、了解棘线鲷微生物状况及其相互关系、营造其生态环境、改善其资源利

用效率等方面提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

研究所用野生棘线鲷于 2020 年 4 月在广东省珠江口万山海洋牧场(113°48'25"E, 21°59'40"N; 113°51'13"E, 22°0'33"N)以拖网作业方式获得。鱼类样品使用浅水 I 型浮游生物网具垂直采样获得, 自海底 22–24 m 深度至海面拖网 1 h, 拖网速度控制在 3–4 Kn。不同鱼类数量的获得与采样区的生物种类和生物密度密切相关。用于实验的棘线鲷据其体长、体重及消化系统发育情况推测已至成鱼阶段。野生鱼类采集后置于 -20 °C 冷冻储存并运回实验室, 鉴定后, 在实验室无菌条件下进行解剖。解剖前先用无菌蒸馏水轻轻擦拭鱼体表面去掉淤泥等污渍后, 用 75% 乙醇擦拭鱼体表面, 解剖所用剪刀、镊子和刮刀都经过灭菌处理后使用, 解剖在超净台内进行, 保障样品不受外援微生物污染。实验所用棘线鲷的相关信息如表 1 所述。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 生工生物工程(上海)股份有限公司和北京全式金生物技术有限公司。27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), 上海美吉生物医药科技有限公司; HiPure Stool DNA Kit 动物粪便样品总 DNA 提取试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; Chelex 100 Resin, Bio-Rad 公司; *Taq* DNA 聚合酶、TransStart *FastPfu* DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, AXYGEN 公司。PCR 仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 小型台式高速离

表 1 实验样品野生棘线鲷的信息

Table 1 Sample information of wild *Grammoplites scaber*

样品编号 Sample No.	全长 Length (cm)	采样站点 Station	实验方法 Experimental method	环境因子 Environmental factors		
				pH	Salinity (%)	Temperature (°C)
DC2_J1	22.5	113°48'25"E 21°59'40"N	免培养 Uncultured method	8.26	32.1	24.8
DC5_J2	18.6	113°51'13"E 22°0'33"N	免培养 Uncultured method	8.28	31.1	24.7
DC5_J1	16.5	113°51'13"E 22°0'33"N	纯培养 Cultured method	8.28	31.1	24.7
DC5_J3	16.5	113°51'13"E 22°0'33"N	纯培养 Cultured method	8.28	31.1	24.7

心机和恒温箱, 艺思高科技公司; NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计, 赛默飞公司。

1.1.3 培养基

YIM171 固体培养基参考文献[17]配制; 10% R2A 固体培养基: 由 R2A 培养基稀释 10 倍使用; 5% 2216E 固体培养基: 由 2216E 培养基稀释 20 倍使用; 50% AIA 培养基: 由 AIA 培养基稀释 2 倍使用; TCBS 琼脂培养基(g/L): 酵母膏粉 5.0, 多价蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 柠檬酸钠 10.0, 硫代硫酸钠 10.0, 胆酸盐 3.0, 牛胆汁粉 5.0, 蔗糖 20.0, 柠檬酸铁 1.0, 溴麝香草酚蓝 0.04, 麝香草酚蓝 0.04, 琼脂 15, pH 8.6±0.2; VRBD 培养基(g/L): 酵母粉 3.0, 蛋白胨 7.0, NaCl 10.0, 葡萄糖 10.0, 胆盐 1.5, 结晶紫 0.002, 中性红 0.003, pH 值 7.3±0.2 (煮沸, 无需高压灭菌); HAH 培养基(g/L): 鱼粉 3.5, disodium EDTA 0.005 6, Na₂CO₃ 0.010 4, vitamin B₁₂ 0.001, cyano trace metal solution 1×10⁻⁶ [乙酸 6.25, 柠檬酸铁铵 6.0, MnCl₂·4H₂O 1.4, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.025, ZnSO₃·7H₂O 0.222], 重铬酸钾 0.05, 琼脂粉 15.00, 海水 500 mL, 蒸馏水 500 mL, pH 7.0–7.6; 反硝化细菌分离培养基^[18]; BTB 培养基; 硝酸盐培养基^[19]: KNO₃ 和 NaNO₃ 分别调整为 3.0 g, 其余均按照原配方比例配制; 铵盐培养基^[19]: (NH₄)₂SO₄ 调整为 3.0 g/L,

其余均按照原配方比例配制; SN 培养基^[20]。

1.2 方法

1.2.1 胃肠道样品处理

在超净台内, 用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)缓冲液将胃肠道外壁上的血液、脂肪等物质冲洗下来后放置在无菌培养皿中, 先纵向剪开胃肠, 挤出内容物后, 用细胞刮刀将残留内容物和内壁黏膜慢慢刮下, 收集内容物和内壁黏膜样品完全剪碎混匀, 用于提取 DNA 和微生物分离实验。

1.2.2 Illumina 测序分析胃肠道菌群多样性

使用 HiPure Stool DNA Kit 动物粪便样品总 DNA 提取试剂盒, 按照说明书提取野生棘线鲷 DC2_J1 和 DC5_J2 的胃肠道环境总 DNA, 使用 NanoDrop 2000 检测其纯度和浓度。测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。使用原核生物 16S rRNA 基因 V1–V3 区通用引物 27F 和 533R 及相应条件^[21], 在 TransStart *FastPfu* DNA 聚合酶的作用下进行靶向扩增。PCR 反应体系: 5×*FastPfu* Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 正、反向引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, *FastPfu* 聚合酶 0.4 μL, BSA 0.2 μL, 模板 DNA (取适量 DNA 提取物稀释至 10 ng/μL) 1 μL, 双蒸水 10.8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个

循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。为了减少实验误差, 每个实验样本进行 3 个重复, 并将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测其长度和浓度。PCR 产物纯化使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 混合产物, Tris-HCl 缓冲液洗脱回收目标 DNA 片段。测序平台为 NovaSeq PE250, 测序方法为双末端 pair-end 法, 测序后使用 fastp 软件对原始序列进行质控处理。根据 97% 的相似度进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列在 Silva 16S rRNA 数据库 (V138) 中进行物种分类注释, 并在门和属水平上进行生物统计学分析。高通量测序原始数据已上传至 SAR 数据库中, 可在 Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) 中检索, 登录号为 SRR17720661 和 SRR17720662。

1.2.3 胃肠道微生物的分离鉴定

每条鱼取出胃肠道处理后, 肠道内容物和肠壁黏膜碎浆合计均在 0.3 g 左右, 用 PBS 缓冲液稀释至 6 mL 用于纯培养平板涂布。分离实验所采用培养基如 1.1.3 所述。

每种培养基涂布 2 个平板, 倒置于 28 °C 恒温培养 2 周, 挑取所有的单菌落以平板划线法在 2216E 固体培养基(MA)上进行纯化。利用 Chelex-100 法^[22]提取纯化后的细菌 DNA, 并采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物由广州天一辉远测序公司完成。测序结果采用 SeqMan5.0 软件进行拼接并在 EzBioCloud 网站(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)进行在线 BLAST 比对, 比对结果按照 98.65% 作为区分物种的标准^[23]。鉴定后的菌株用 30% (质量体积分数) 甘油管置于 -80 °C 冰

箱中保藏。

2 结果与分析

2.1 棘线鲷胃肠道微生物 16S rRNA 基因高通量测序

2.1.1 α 多样性分析

本研究对从 DC2 和 DC5 两个站点所获得的棘线鲷胃肠道样品进行 Illumina HiSeq 测序, 共获得 97 026 条序列。这些序列归属为 457 个 OTU, 其中 DC5_J2 样品中获得 96 个 OTU, DC2_J1 样品中获得了 437 个 OTU, 仅有 76 个 OTU 为两个站点的棘线鲷所共有(图 1)。样本中物种覆盖度均大于 99% (表 2), 表明本次测序结果基本代表了样本中微生物群落的真实情况。群落丰富度 Chao1 指数为 437.54 (DC2_J1) 和 153.27 (DC5_J2), 相比之下, DC2_J1 样品的群落丰富度明显高于 DC5_J2 样品。可反映物种 α 多样性的指数 Shannon 和 Simpson, 如表 2 所示, 二者共同表明 DC2_J1 样本具有较 DC5_J2 样本更高的物种多样性。对于物种多样性方面一个不可忽视的问题是细菌 16S rRNA 基因多拷贝现象普遍, 特别是高通量测序会导致高估环境中微生物在 OTU 水平的多样性^[24], 为了尽量减少这种影响, 本论文重点讨论属及以上类群, 并且重点在相对量上讨论, 以提高本研究数据的科学性。

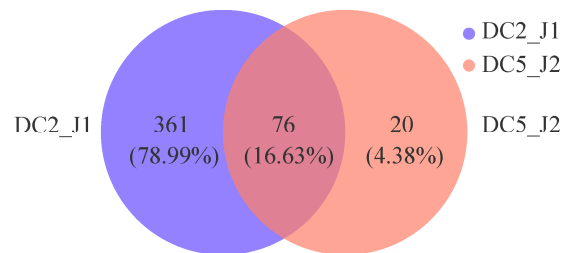


图 1 两条棘线鲷胃肠道样品共有或特有物种 Venn 图
Figure 1 Venn diagram for common or unique species in two intestinal samples of *Grammoplites scaber*.

表 2 棘线鲮胃肠道样品的测序信息和多样性评估值

Table 2 Sequence data and diversity estimates of intestinal tract microbes in *Grammoplites scaber*

Sample ID	Number of Seq	Number of OTU	Shannon index	Simpson index	Chao1 index	Phylogenetic diversity	Good's coverage
DC2_J1	48 513	437	3.001 426	0.127 49	437.535 714	62.259 11	0.999 876
DC5_J2	48 513	96	1.663 717	0.266 89	153.272 727	15.847 48	0.999 431

2.1.2 微生物组成及多样性

将测序所得的 OTU 进行比对分析, 得到棘线鲮肠道样品中细菌的分类地位和组成情况。图 2 分别展示的是相对丰度 0.01% 以上的门级和属级水平分类。由图 2 可知, 在门级分类水平上厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)是野生棘线鲮胃肠道内的绝对优势门级类群, 在 DC2_J1 样本中的占比分别为 40.31% 和 22.18%, 在 DC5_J2 样本中的占比分别为 81.17% 和 18.16%。此外, 放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和浮霉菌门(*Planctomycetes*)也存在于 2 份样本中(DC2_J1 中占比分别为 7.16%、1.23% 和 1.38%; DC5_J2 中分别为 0.44%、0.01% 和 0.11%)。虽然它们的相对丰度优势不及厚壁菌门和变形菌门明显, 但它们在样本中均普遍存在, 因此, 厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和浮霉菌门应为野生棘线鲮胃肠道样品中常见的细菌类群, 其中厚壁菌门和变形菌门占据绝对优势。

值得注意的是, 在 DC2_J1 棘线鲮的胃肠道菌群中出现了丰度较高的叶绿体(norank Chloroplast)序列, 占比达 25.11%, 虽然在 DC5_J2 中也有发现, 但占比仅有 0.07%, 可见棘线鲮可能存在植食性的情况。我们从高通量测序结果中发现, 蓝藻门在该鱼的胃肠道内相对丰度较高(综合占比 12.38%), 但多为未分类类群, 蓝藻门已知分类类群中最多的是聚球藻(*Synechococcus*)。聚球藻在 DC5_J2 中占比为 0.014%, 在 DC2_J1 中占比为 0.210%, 综合样品 DC5_J2 和 DC2_J1 发现, 聚球藻在蓝藻门中的占比为 1.02%。蓝

藻门的存在对水产动物具有双重效果。蓝藻能产生抗病毒因子等多种免疫促进因子^[25], 常被作为饲料添加剂应用于水产养殖中, 以达到抑制水产动物细菌性疾病的目的。但蓝藻过多也容易在生物体内累积生物毒素, 如对人 and 动物都有危害的微囊藻毒素。

在属级分类水平上, 共发现 201 个属级类群, 分布在 146 个科内; 两份样品中发现的共有属级类群有梭菌属(*Clostridium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、雷尔氏菌属(*Ralstonia*)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、发光杆菌属(*Photobacterium*), 以及一些未分类的柄杆菌科和红杆菌科的相关属级类群。梭菌属在两份样品中的丰度最高, 分别为 33.07% (DC2_J1) 和 81.15% (DC5_J2)。但综合两份样品的所有梭菌属来看, 未分类的梭菌可达 99.81%。野生棘线鲮胃肠道内的梭菌属可归类于 I 菌簇, 该类群大多能形成芽孢, 具有鞭毛且多为厌氧生长的革兰氏阳性腐生菌, 少数为致病菌。据报道, 梭菌属可产生具有保护肠黏膜屏障的短链脂肪酸, 并且为肠道提供特殊营养和能量成分^[26]。此外, 梭菌属菌株可降解纤维素且常在淡水鱼食草鱼类的肠道中占据优势地位^[27]。据此推测, 野生棘线鲮有进行植物性食物摄食的可能性。

本研究在了解棘线鲮胃肠道环境微生物组成的基础上, 基于样本群落丰度数据, 运用统计学方法检测了 DC2_J1 和 DC5_J2 这 2 个样本微生物群落中具有显著丰度差异的物种, 采用费舍尔精确检验进行假设性检验后得到图 3。虽然图 3 展现出的物种大多为未分类物种,

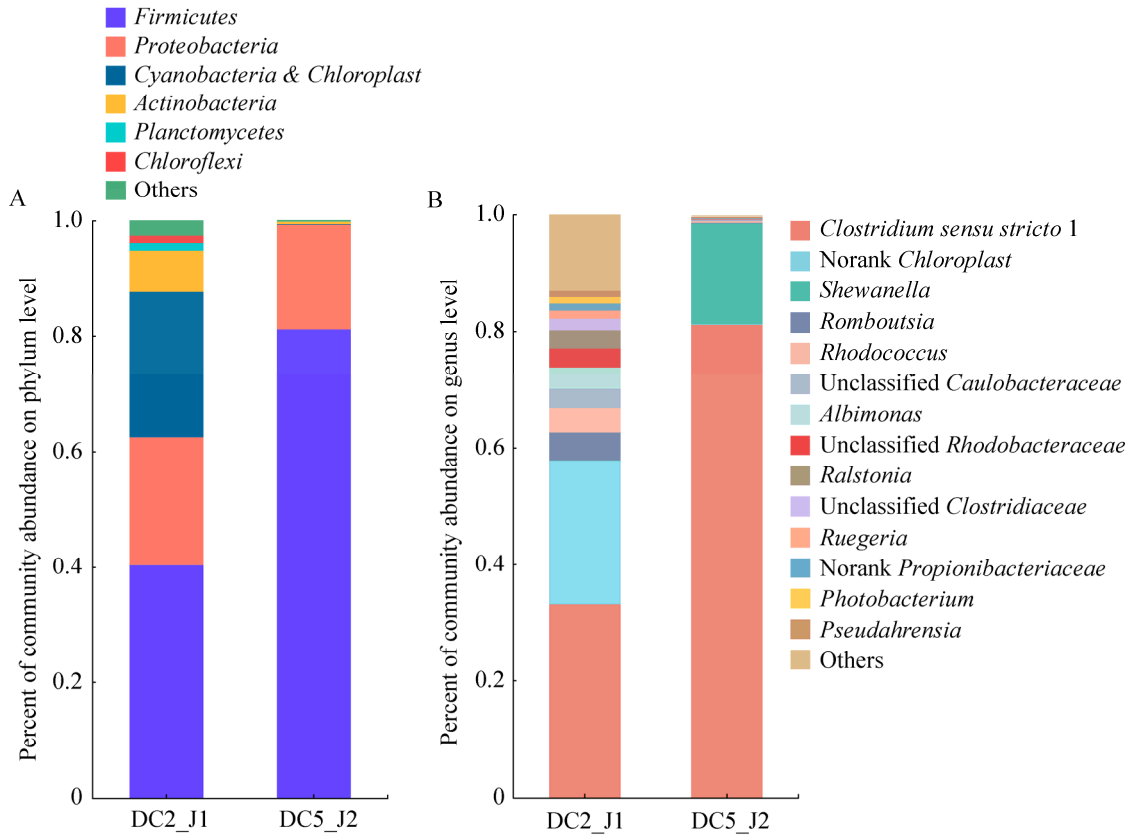


图 2 棘线鲷胃肠道细菌群落在门水平(A)和属水平(B)的组成情况

Figure 2 Bacterial composition at the levels of phylum (A) and genus (B) in intestinal samples of *G. scaber*.

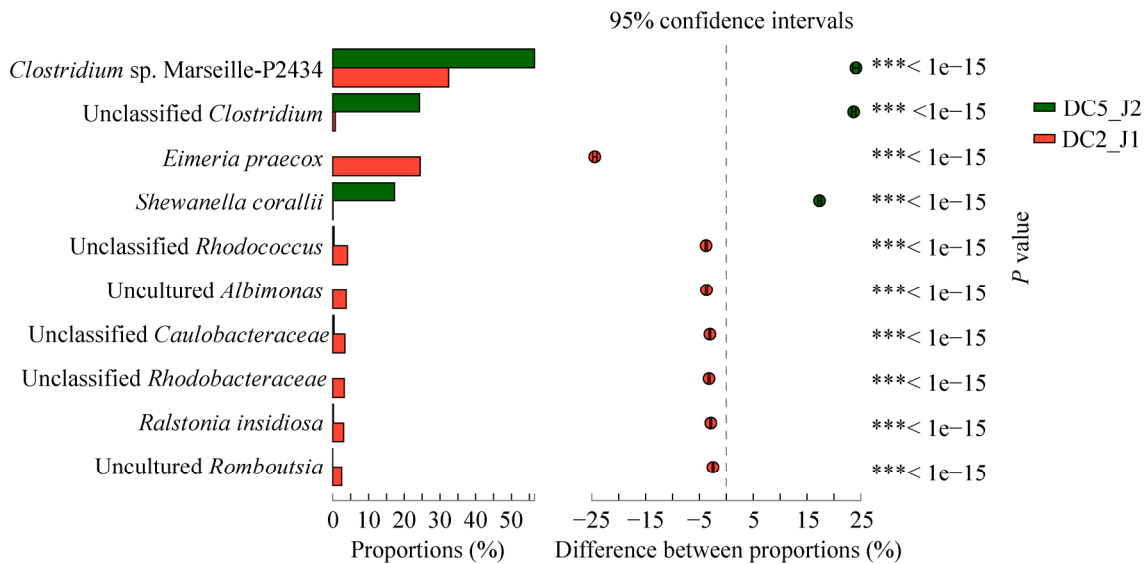


图 3 两样本中丰度前十的物种差异比较

Figure 3 Comparison for the top ten abundant species in two samples.

但仍可看出前两个差异物种为梭菌属且它们多分布于 DC5_J2 样本中。其次,原核微生物有两个已知分类的物种分别为珊瑚希瓦氏菌(*Shewanella corallii*)和危险罗尔斯通氏菌(*Ralstonia insidiosa*)。*S. corallii* 最初分离自珊瑚^[28],后在河豚中也有发现,其具有多种抗生素基因和铜稳态等有毒化合物的耐药基因^[29]; *R. insidiosa* 是强生物膜产生菌,有报道称其与传染病相关,其可在非生物表面上形成生物膜,可促进致病菌与生物膜结合并为致病菌提供保护性微生境,常在食源性疾病暴发中发挥作用^[30]。然而差异分析结果显示,这 2 个原核微生物物种中与致病性相关的菌株在 DC2_J1 样本中的丰度较高。

2.1.3 肠道微生物表型和功能预测

使用 BugBase (<https://bugbase.cs.umn.edu/>) 基于 16S rRNA 基因序列 OTU 对棘线鲷胃肠道微生物的需氧情况、革兰氏阴性/阳性、潜在致病性、可移动元件、生物膜形成和耐受性等 9 个表型的生物水平覆盖情况进行了预测(表 3),结果显示,在菌群多样性较高的 DC2_J1 棘线鲷胃肠道内,需氧菌和厌氧菌较为均衡,而在多样性低的 DC5_J2 棘线鲷的胃肠道内有着更多的厌氧菌,其丰度可达 94.24%。厌氧微生物在鱼类肠道内主要是紧贴肠壁生长,常常表现出与宿主共生关系;而好氧微生物需要氧气的生存条件决定了它们在肠道内要远离肠壁,多游离于肠腔中间。因此,在水产动物的胃肠道微生物群落中,厌氧菌含量往往远多于好氧菌^[31]。由此,我们推测,DC5_J2 的菌群更倾向于棘线鲷胃肠道内的定殖菌。在预测的具潜在致病性的微生物水平覆盖率中,DC2_J1 占比为 7.82%,DC5_J2 占比为 0.37%,DC2_J1 样本中存在较 DC5_J2 高比例的潜在致病性菌株,同时,参与成膜的微生物比例也远高于 DC5_J2 (DC2_J1 为 52.19%,DC5_J2 为 5.21%)。在微生物与宿主

表 3 棘线鲷胃肠道微生物预测表型的相对丰度
Table 3 Relative abundance of phenotype prediction by intestinal microorganisms in *Grammoplites scaber* (%)

Phenotypes	DC2_J1	DC5_J2
Aerobic	44.82	4.96
Anaerobic	44.61	94.24
Contains mobile elements	10.86	0.75
Facultatively anaerobic	5.68	0.22
Forms biofilms	52.19	5.21
Gram negative	41.48	27.73
Gram positive	58.52	72.27
Potentially pathogenic	7.82	0.37
Stress tolerant	8.79	0.50

相互作用下,生物膜可以为微生物提供逃避宿主防御的小生境,因此,生物膜常被认为在微生物致病中发挥重要作用^[32]。结合前文中对丰度前十的物种分析时发现了强生物膜产生菌 *R. insidiosa* 的存在,而且其在 DC2_J1 中占比 3.047%,在 DC5_J2 中占比为 0.139%。这一发现与表型预测结果的推断基本吻合,说明 DC2_J1 样本中存在较高比例的潜在致病性菌株。

由于本次实验所用棘线鲷样品是在珠江口捕捞的天然野生鱼类,对其前期生长状态缺乏观察,综合表型预测的肠道细菌需氧情况及参与成膜微生物和潜在致病菌的相关情况,我们初步推测,DC5_J2 样本中的微生物组成更能代表野生棘线鲷胃肠道微生物群落的组成情况,DC2_J1 棘线鲷可能处于摄食不久的状态,推测 DC5_J2 的生理状态相比 DC2_J1 要更健康一些。

使用 FAPROTAX (http://www.ehbio.com/ImageGP/index.php/Home/Index/FAPROTA_X.html), 基于 16S rRNA 基因对棘线鲷胃肠道内的微生物群落进行功能预测,分析整理了属级分类水平上潜在致病性菌和有益菌情况(表 4)。从功能预测结果来看,棘线鲷胃肠道的有益菌株多为功能性菌株且丰度较低,若这些菌株获得纯培养,

表 4 潜在致病菌和有益菌属级类群的相对丰度

Table 4 Relative abundance of potential pathogenic and beneficial bacteria

属名 Genus name	样品中的菌株 Strains in sample	功能或致病性 Function or pathogenicity	属级相对丰度 Abundance (%)
有益菌属 Beneficial bacteria			
产碱杆菌属 <i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i>	亚砷酸盐氧化解毒, 反硝化作用 Arsenate oxidation detoxification, denitrification	0.012
博斯氏菌属 <i>Bosea</i>	<i>B. massiliensis</i>	硫化物氧化 Sulfide oxidation	0.052
丝硫菌属 <i>Thiothrix</i>	未分类菌株 Unclassified	硫化物氧化 Sulfide oxidation	0.010
鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	<i>S. paucimobilis</i> <i>S. koreensis</i>	多环芳烃(PAH)降解, 降解蓝藻产生的微藻毒素 ^[33] Degradation of PAH, degradation of microalgae toxin	0.007
潜在致病菌属 Potential pathogen			
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	<i>A. baumannii</i>	侵害上皮细胞, 诱发细胞凋亡 ^[34] Invasion of epithelial cells leading to apoptosis	0.152
普罗维登斯菌属 <i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i>	引发败血症和脑膜炎 ^[35] Related to sepsis and meningitis	0.028
梭菌属 <i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i>	产生多种毒素, 引发组织坏死 ^[31] Related to tissue necrosis	57.178
柯克斯氏体属 <i>Coxiella</i>	未分类菌株 Unclassified	诱发 Q 热病 ^[36] Related to Q fever	0.058
寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	未分类菌株 Unclassified	条件致病, 诱发脑膜炎 ^[37] Related to meningitis	0.016
罗尔斯通氏菌 <i>Ralstonia</i>	<i>R. insidiosa</i>	强生物膜产生菌 ^[30] Biofilm-producing bacteria	1.593

注: 相对丰度的数据是基于两条棘线鲷胃肠道内微生物群落所计算的总体丰度

Note: The relative abundance data were obtained from the total abundance of two gastrointestinal samples of *G. scaber*.

将在特定化合物或元素的工业降解上有更好的应用; 同时, 具有降解微藻毒素的鞘脂单胞菌属在肠道样品中被发现, 说明野生棘线鲷的胃肠道菌群在维持宿主生理健康稳态方面存在相应的应对机制。例如, 若棘线鲷胃肠道中累积了较多蓝藻而造成微藻毒素累积, 则单胞菌属可对微藻毒素进行降解, 而本文的高通量测序结果也显示出蓝藻门比例高, 但具有潜在致病性的菌株, 主要是狭义梭菌属 1 (*Clostridium sensu stricto* 1), 丰度可达 57.178%。梭菌属也可分为有益菌和有害菌两大类。本文综合高通量测序获得的 16S rRNA 基因的 OTU 丰度表和功能预测结果分析发现, 棘线鲷胃肠道内的梭菌属大多为未分类的梭菌属, 其中有害梭菌为

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*), 其总相对丰度约为 0.099%。产气荚膜梭菌可产生多种外毒素, 对人类也具有条件致病性, 可引起不同程度的组织坏死, 严重的可诱发坏死性肠炎、气性坏疽^[33]。此外, 在 DC2_J1 样本中还检测到较低丰度的大洋梭菌(*Clostridium oceanicum*), 该类群的初次分离源自海洋沉积物, 是具有蛋白和卵磷脂水解功能的厌氧菌, 而且具有轻微的糖化作用^[38], 该菌种在肠道内生长可起到协助宿主消化的作用。

2.2 棘线鲷胃肠道微生物纯培养

2.2.1 纯培养微生物多样性

本研究采用 12 种培养基对 DC5_J1 和 DC5_J3 的胃肠道样品进行实验室培养, 共获得

99 株细菌。16S rRNA 基因序列分析鉴定结果显示, 它们分属于 3 个门 4 个纲 10 个目 10 个科 13 个属。其中, 变形菌门占 50.51%, 放线菌门占 31.31%, 厚壁菌门占 18.18% (图 4)。实现纯培养最多的属级类群是嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*), 共分离得到 6 个物种, 占比为 35.35%, 其中最多的是与 *Psychrobacter cibarii* 相似度在 99.72%–99.93% 的菌株。嗜冷杆菌属通常发现于鱼类和家禽加工产品中^[39], 在深海沉积物中也有纯培养发现^[40], 该类群大部分都具有产生胞外酶功能且以脂酶和蛋白酶为主^[41], 它们在肠道内定殖可以更好地帮助宿主消化吸收动物性食物。此外, 链霉菌属 (*Streptomyces*) 是获得纯培养第二多的属级类群, 占比 27.27%,

均来源于 YIM171 培养基。分离培养得到的链霉菌均与 *Streptomyces cacaoi* 高度相似 (99.71%–100%), 该菌可产生氨基糖苷类抗生素, 对真菌有明显的抑制作用^[42]。

从不同培养基获得菌株的情况来看, YIM171 培养基分离得到的菌株最多但十分单一, 共分离得到 27 株, 但均为 *Streptomyces*。SN 培养基分离得到的菌株多样性最好, 共分离获得 16 株菌, 分属于 6 个属; 其次是 10% R2A 培养基, 分离培养获得了 4 个属级类群。我们发现, 选择寡营养类的培养基可有效地提升纯培养获得菌株的多样性。然而在本次纯培养实验中, 我们选用的 VRBD 培养基为常见的动物肠道微生物培养基却未见菌落生长 (图 5)。

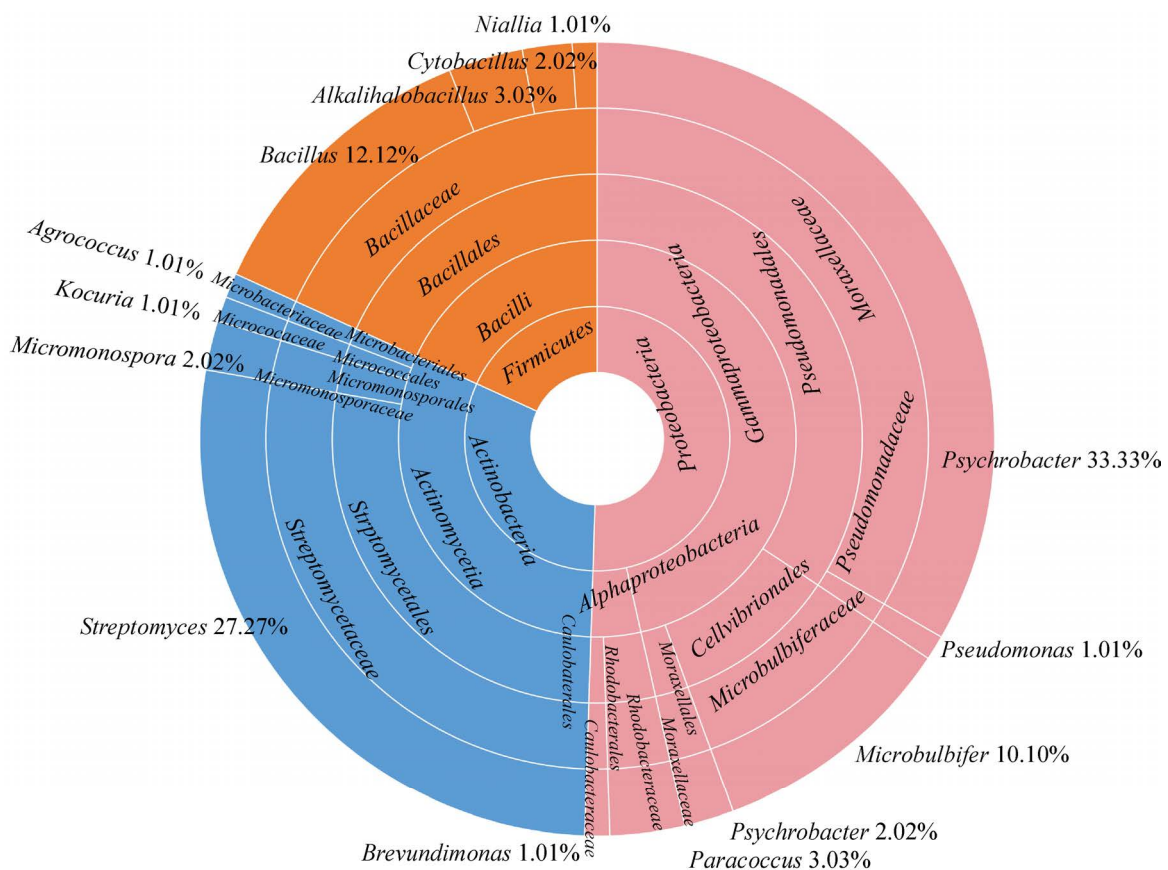


图 4 棘线鲷胃肠道样品纯培养微生物组成

Figure 4 The pure cultured microbial diversity of *G. scaber*.

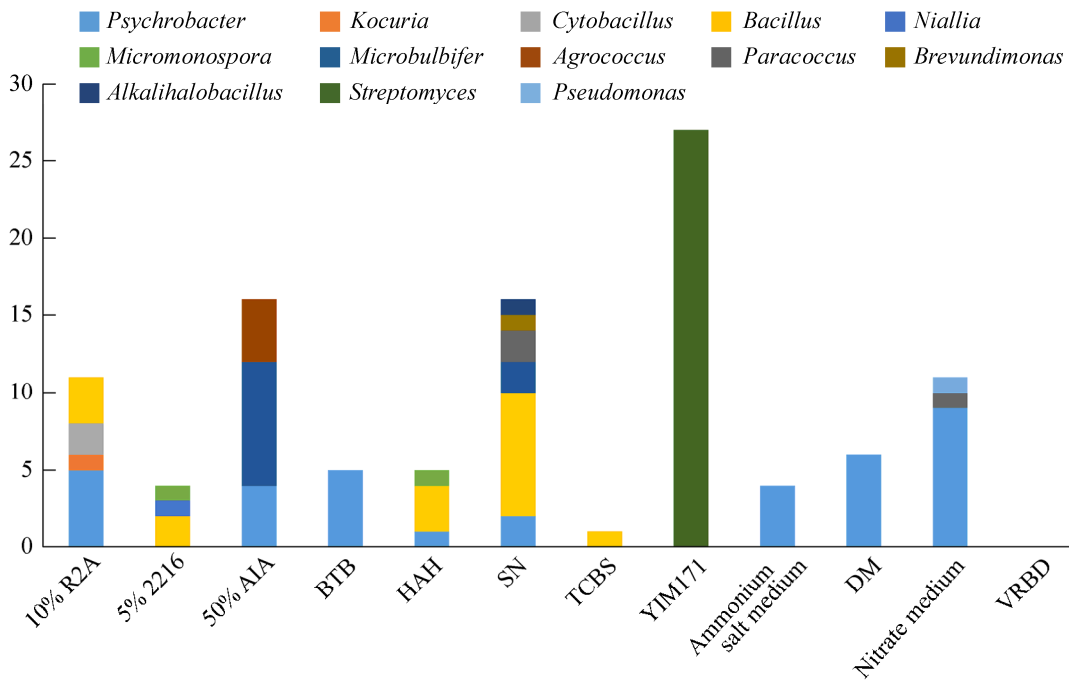


图5 不同培养基分离得到的菌株数量

Figure 5 Strain number picked from different isolation media.

依据 16S rRNA 基因相似度 98.65% 的物种标准, 纯培养实验中共分离得到 2 株潜在新物种, 与最相近菌种 *Pseudomonas hunanensis* 和 *Agrococcus baldri* 的 16S rRNA 基因相似度分别为 98.24% 和 98.48%。本次纯培养实验获得的所有纯培养菌株去除重复后共有 22 个物种, 图 6 为 22 个物种与其最相近菌种的系统发育树。其中, 放线菌纲 5 个, 芽孢杆菌纲 7 个, γ 变形菌纲 8 个, α 变形菌纲 2 个。

2.2.2 纯培养类群功能预测分析

采用 PICRUST2 软件对纯培养菌株类群 8 类生物代谢通路进行功能预测(图 7), 结果显示, 纯培养菌株的主要通路为编码功能蛋白及代谢相关, 丰度分别为 32.35%、38.06%。纯培养类群具有相对较高丰度的碳水化合物代谢、氨基酸代谢、维生素和辅助因子代谢及脂类代谢通路, 同时也存在一定丰度的膜转运和信号传导通路, 以及产生胞外蛋白或胞外酶的能力, 具

有协助宿主进行消化吸收的潜能, 也为分离培养实验提供了一定的借鉴思路。

2.3 野生棘线鲷胃肠道微生物纯培养和免培养多样性结果分析

野生棘线鲷胃肠道微生物免培养数据和分析结果可以为纯培养实验提供一定的指导。本研究通过免培养方法统计了来源于珠江口海域的野生棘线鲷胃肠道微生物组成, 并揭示了厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和浮霉菌门为野生棘线鲷胃肠道内普遍存在的细菌类群, 其中以厚壁菌门和变形菌门为野生棘线鲷胃肠道的绝对优势门级类群。与免培养结果不同的是, 我们利用 12 种不同的分离培养基对其胃肠道样品进行分离获得了变形菌门(50.50%)、厚壁菌门(18.18%)和放线菌门(31.31%)这 3 个门级类群, 其中以变形菌门为主要的优势类群, 其次是放线菌门。放线菌门分属于 4 个不同的属级类群: 链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属

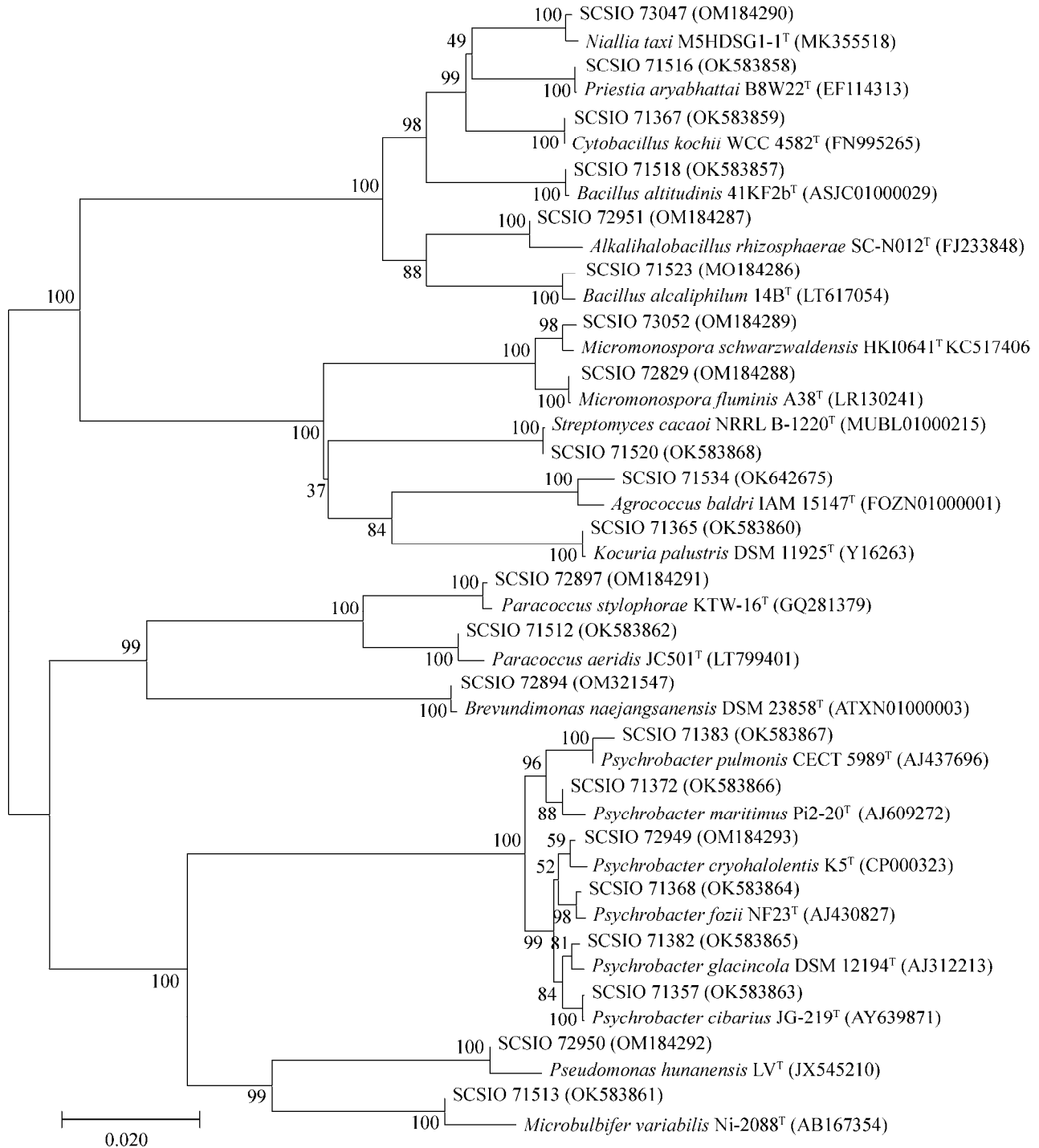


图 6 采用邻接法构建纯培养物种的 16S rRNA 基因系统发育树 标尺 0.020 代表序列偏差值；分支点上的数字代表计算 1 000 次后聚类到一起的概率；括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号

Figure 6 Neighbor-joining phylogenetic tree reconstructed based on 16S rRNA gene sequences of cultural species and their neighbors. The value of 0.020 represents the sequence deviation value; The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees; The serial number in brackets is the GenBank login number of the strain.

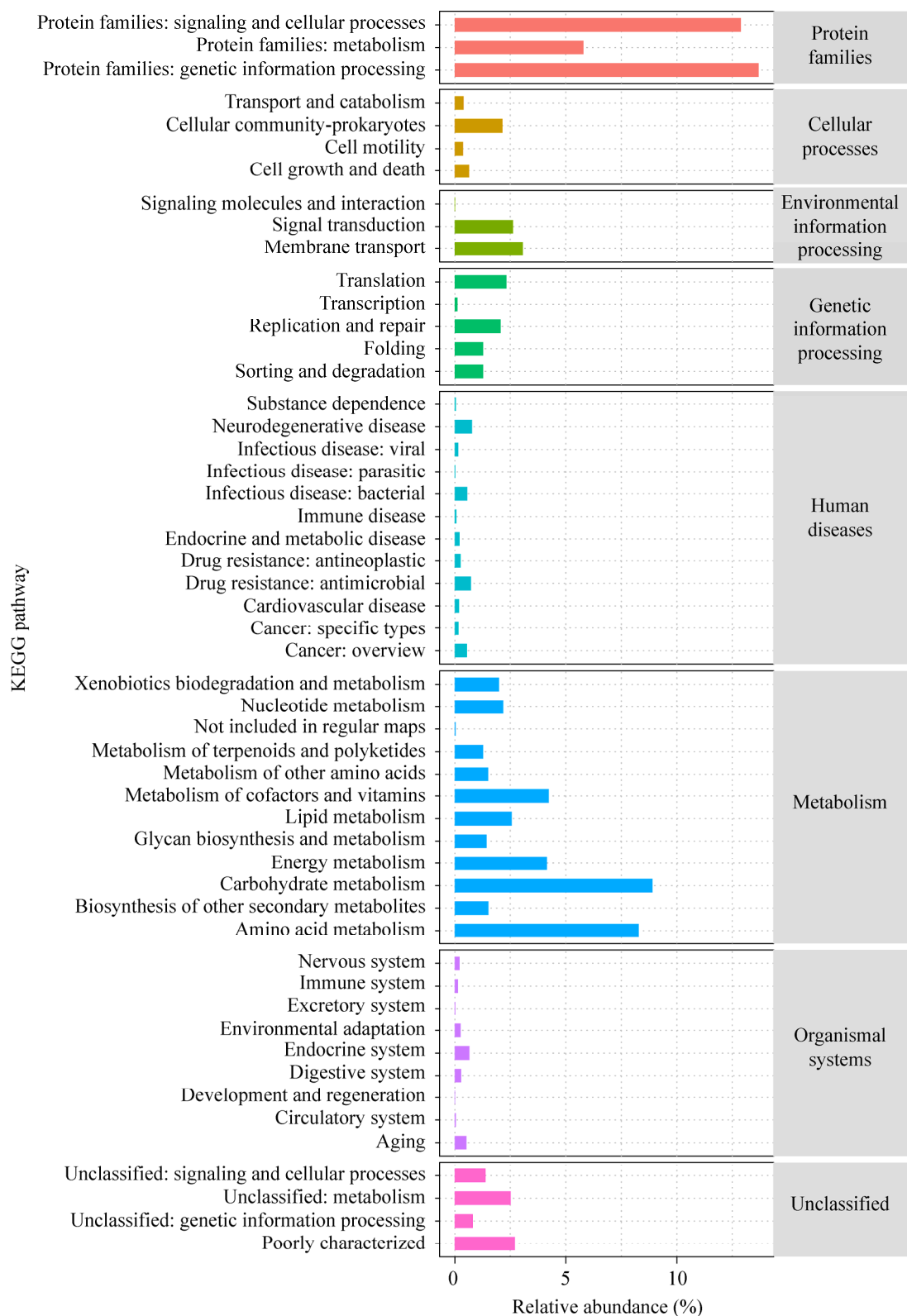


图 7 纯培养菌群基于 KEGG 功能预测丰度图

Figure 7 KEGG function prediction abundance of pure culture microbiota.

(*Micromonospora*)、库克菌属(*Kocuria*)和土壤球菌属(*Agrococcus*),其中以链霉菌属居多,占比为 27.27%,显著提升了放线菌门的比重;而链霉菌属多来自 YIM171 培养基,出现这一差异的原因可能正与此培养基的选择有关。但是纯培养实验和免培养结果也共同确认了变形菌门在野生棘线鲷胃肠道内的优势地位。

此外,通过以免培养数据获得的 OTU 丰度表进行功能预测时,发现了具有反硝化作用的粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)的存在。已知反硝化作用是自然界中氮元素循环的一个重要途径,水体中的反硝化细菌可有效帮助解决水产养殖过程中溶解态氮(硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐)积累的问题^[43]。因此,我们在纯培养实验中以免培养检测结果为依据,采用了多种利于反硝化细菌生长的培养基[反硝化细菌培养基(DM)、铵盐培养基和硝酸盐培养基等]。虽然纯培养实验中并未获得预期的产碱杆菌属(*Alcaligenes*),但在这些培养基上出现了更适合生长的嗜冷杆

菌属(*Psychrobacter*),所获得菌株在反硝化细菌显色培养基上存在显色反应,但具体的反硝化效果还需进一步验证和测定。

通过免培养的 OTU 丰度对比纯培养实验结果,在属级类群上,纯培养实验共获得了 13 个不同的属级类群,其中仅有 5 个属与免培养结果一致,而有 8 个属仅由纯培养实验获得(图 8)。同时,免培养结果虽然揭示了肠道内存在大量的不同属级类群,但约有 20.52%为未分类的属级类群。纯培养结果与免培养的差异也说明免培养虽然可以较系统地展示样品的微生物组成,但也存在不能检测到的类群盲区,因此,免培养和纯培养手段相结合才能更加客观地反映环境中总体的微生物多样性情况。

3 讨论与结论

海洋鱼类作为重要的海洋食物来源,其食品安全和养殖生态问题备受关注。Kokou 等通过研究不同鱼类胃肠道微生物群落特征,进一步

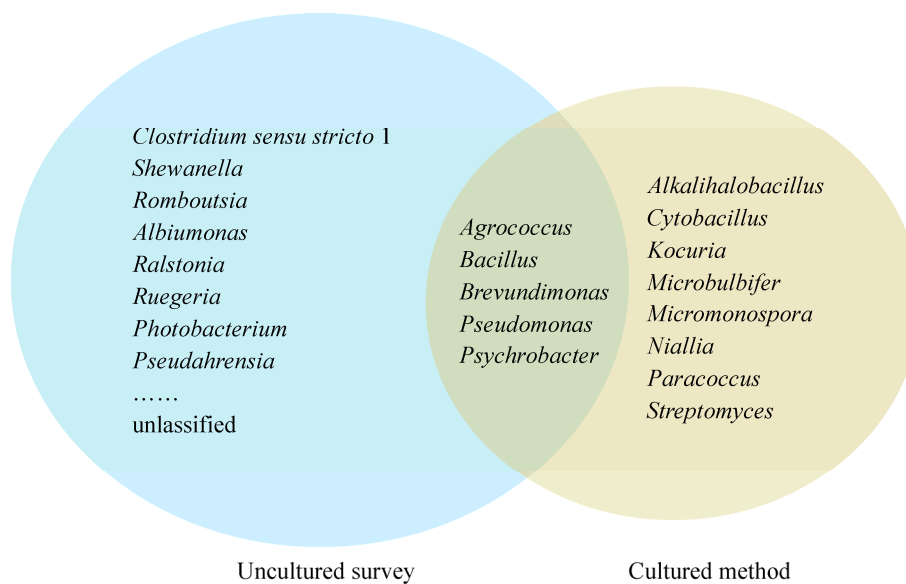


图 8 纯培养和免培养方法获得的棘线鲷胃肠道微生物在属水平上的差异比较

Figure 8 Comparison at genus-level of microbes obtained from cultured and uncultured methods from *G. scaber* gastrointestinal tract environments.

证实了核心肠道菌群是由与宿主互惠作用的菌株演变而来^[44]。因此, 正确阐述海洋鱼类胃肠道核心菌群, 有利于海水养殖过程中从生物角度添加饲料益生菌来提高养殖鱼类的生理健康。然而, 想要定义核心菌群是一项十分艰难的工作, 因为每个群落内的生态关系是极其复杂的, 需要考虑组成、系统发育、持久性和连通性等因素^[45]。自从 2004 年 Rawls 等成功建立了无菌斑马鱼的模式生物^[46], 为海洋鱼类各方面研究创造了极大的可能性, 在此基础上, 人们成功证实肠道微生物群对鱼类生长发育的促进作用^[47]。截至目前, 对鱼类肠道微生物群的研究主要集中在斑马鱼^[48]、孔雀鱼^[49]和虹鳟鱼^[50]等模式生物, 以及褐牙鲂(*Paralichthys olivaceus*)^[47]、褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)^[51]、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)^[52]、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)^[53]等食用价值高的经济鱼类。然而这些研究还不足以全面了解海洋鱼类肠道菌群的组成和协同进化模式, 而且微生物在海洋动物和其他水生生物消化系统中的定殖往往受到若干宿主和环境因素的共同影响^[54], 如宿主摄入周围自由生存的细菌群落^[55]、宿主胃肠道的物理化学变化^[56]、生境的季节性变化^[57]、宿主的生活史和饮食习性^[27]等, 这往往导致不同鱼类的菌群差异较大。相较于自然环境下生存的野生物种, 养殖物种的生存环境在水源水质、生境结构、生长密度和饮食等方面经过了人为的重造, 这很可能导致生物肠道菌群发生重构^[58]。因此, 野生物种的肠道菌群往往更接近宿主生物的自然常规菌群, 能够更好、更全面地了解野生鱼类的肠道微生物组成, 为确定其核心菌群积累科学数据。

本研究对海洋牧场区域内野生棘线鲷胃肠道的微生物群落组成和特点进行分析, 发现在棘线鲷胃肠道内致病性菌群和有益菌群并存, 并通过选用不同的培养基来还原其胃肠道菌群

的组成情况, 获得了该类鱼胃肠道微生物的第一手数据。免培养实验结果显示, 厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和浮霉菌门为野生棘线鲷胃肠道样品中普遍存在的细菌类群, 其中, 厚壁菌门和变形菌门是绝对优势门级类群。厚壁菌门多为可以产生芽孢具有抗逆性的类群, 该类群可能更能适应肠道内较酸性的环境, 而且能够产生胞外酶有效协助宿主的消化作用。变形杆菌的广泛存在也可能与变形菌门是原核微生物中最大、表型最多样化的类群有关^[12]。此外, 免培养和纯培养结果综合分析后, 我们对野生棘线鲷的摄食习性有了新的见解和猜测。例如, 虽然 DC2_J1 样本相比 DC5_J2 样本具有更高的胃肠道微生物群落多样性, 但是结合功能表型预测后, 我们推测 DC5_J2 样本的微生物构成更倾向于野生棘线鲷胃肠道微生物的定殖菌群, DC2_J1 样本可能处于刚摄食不久的状态。另外, 通常轮虫、枝角目和桡足类等初级消费浮游动物会以蓝藻为食, 鱼类若以这些浮游动物或蓝藻为食, 就会导致胃肠道内出现蓝藻门的积累^[59], 甚至还会导致微藻毒素在鱼类体内富集, 而功能预测发现了具有降解微藻毒素功能鞘氨醇单胞菌的存在, 正好可以缓解微藻毒素的伤害。此外, 在棘线鲷胃肠道内检测到的聚球藻能够产生抑菌、抗氧化活性物质, 也可为宿主提供一定程度的抗菌帮助^[25]。这一现象也说明野生棘线鲷的胃肠道内的菌群之间具有一定的相互制约趋势, 以此来维持胃肠道环境的微生态平衡。

除了摄食浮游动物, 我们也同时检测到了高丰度的 I 类梭菌属(*Clostridium sensu stricto* 1), 该类群可以产生纤维素酶, 与草食性鱼类强大的水生植物纤维素消化能力密切相关^[47]。也有相关研究报道, 梭菌属在草食性鱼类肠道内占据高丰度的优势地位, 而且是重要的纤维素降解

菌^[60-63]。综合 DC2_J1 胃肠道内检测到高丰度的叶绿体序列, 我们推测棘线鲷具有摄食植物性食物的可能, 这与目前文献中记录的棘线鲷以小鱼和甲壳类为食^[15]不同。在纯培养实验中, 我们分离获得了较多的可产生脂酶和蛋白酶的嗜冷杆菌, 印证了棘线鲷摄取动物性食物的记载。综上所述, 我们认为棘线鲷在自然环境下可能为杂食性海洋鱼类。

免培养结果揭示了野生棘线鲷胃肠道内具有高丰度的梭菌, 而我们纯培养实验却未获得梭菌属相关菌株。究其原因是 I 类梭菌属多为厌氧生长, 少数微需氧, 而本研究在实验室的培养过程中并未设置无氧培养条件, 这可能是导致未能获得该类微生物的原因。因此, 提高纯培养微生物多样性需要在分离培养时不应仅限于培养基的选择, 还应尽可能选择多种不同的培养条件进行。本研究基于纯培养实验和免培养方法分析展示了野生棘线鲷胃肠道微生物群落特征, 揭示了野生棘线鲷胃肠道微生物多样性及其有益和有害微生物类群, 有助于我们更全面地把握自然生长状态下棘线鲷胃肠道内的微生态环境状况, 同时对丰富多样的硬骨鱼类核心肠道菌群的研究提供数据支撑。然而, 本实验的样品采集完全为海上野生捕捞, 采样难度较大、随机性强、样本数量较少、个体不均一, 这也导致分析结果具有一定的局限性, 但对于野生鱼类肠道样品采集这种情况较难避免。因此, 本文在针对野生棘线鲷胃肠道微生物多样性分析时, 仅能谨慎阐述其优势类群。若要进一步确定棘线鲷胃肠道核心菌群还需进行大范围取样, 综合季节性、鱼龄和高中低纬度海域等因素扩大样品数量进行更为全面的分析。由于自然环境中健康野生鱼类基本数据的不足仍是阻碍益生菌研究的一大难题^[64]。因此, 野生海洋鱼类肠道微生物的研究还有很大的空

白需要填补, 鉴于本研究的局限, 后期需要从更加系统的角度解析核心菌群的存在和功能。野生棘线鲷胃肠道内有益菌和有害菌的揭示, 不但为我们海洋牧场建设下的水产品健康养殖提供帮助, 也提示我们在海洋野生水产品的食用加工时特别注意这些潜在的人类致病微生物, 避免直接食用, 确保食用安全。

REFERENCES

- [1] Wang AR, Ran C, Ringø E, Zhou ZG. Progress in fish gastrointestinal microbiota research[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(3): 626-640
- [2] Wang XB, Shang YQ, Wei QG, Wu XY, Dou HS, Zhang HX, Zhou SY, Sha WL, Sun GL, Ma SC, et al. Comparative analyses of the gut microbiome of two fox species, the red fox (*Vulpes vulpes*) and corsac fox (*Vulpes corsac*), that occupy different ecological niches[J]. *Microbial Ecology*, 2022, 83(3): 753-765
- [3] Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 65-80
- [4] Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2012, 18(5): 968-984
- [5] Tarnecki AM, Burgos FA, Ray CL, Arias CR. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(1): 2-17
- [6] Jones J, DiBattista JD, Stat M, Bunce M, Boyce MC, Fairclough DV, Travers MJ, Huggett MJ. The microbiome of the gastrointestinal tract of a range-shifting marine herbivorous fish[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2000
- [7] Askarian F, Zhou ZG, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens[J]. *Aquaculture*, 2012, 326/327/328/329: 1-8
- [8] Askarian F, Sperstad S, Merrifield DL, Ray AK, Ringø E. 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
- [9] Lai KP, Lin X, Tam N, Ho JCH, Wong MKS, Gu J, Chan

- TF, Tse WKF. Osmotic stress induces gut microbiota community shift in fish[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(9): 3784-3802
- [10] Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S, McHardy AC, Dangl JL, Knight R, Ley R, et al. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 603-616
- [11] Solovyev MM, Kashinskaya EN, Bochkarev NA, Andreev KB, Simonov E. The effect of diet on the structure of gut bacterial community of sympatric pair of whitefishes (*Coregonus lavaretus*): one story more[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e8005
- [12] Luo M, An R, Fu J, Wan S, Zhu W. Comparative analysis of the gut microbiota in bighead carp under different culture patterns[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(2): 1357-1369
- [13] Zhu P, Wong MKS, Lin X, Chan TF, Wong CKC, Lai KP, Tse WKF. Changes of the intestinal microbiota along the gut of Japanese Eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 73(4): 529-541
- [14] Froese R, D Pauly. Editors. 2021. FishBase. world wide web electronic publication. www.fishbase.org. <https://fishbase.mnhn.fr/summary/Grammoplites-scaber.html>
- [15] Simanjuntak C, Zahid A. Kebiasaan makanan Dan perubahan ontogenetik makanan ikan baji-baji (*Grammoplites scaber*) di Pantai Mayangan, Jawa Barat[J]. *Jurnal ikiologi indonesia*, 2009, 9(1): 63-73
- [16] 李磊. 珠江口海洋牧场建设思考[J]. *海洋开发与管理*, 2010, 27(9): 105-108
- Li L. Thoughts on the construction of marine ranch in Pearl River Estuary[J]. *Ocean Development and Management*, 2010, 27(9): 105-108 (in Chinese)
- [17] 石松标, 杨立芳, 姜明国, 张坤, 姜龙芊, 李桂鼎, 姜怡. 广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2331-2340
- Shi SB, Yang LF, Jiang MG, Zhang K, Jiang LQ, Li GD, Jiang Y. A comparison of actinomycetes isolation medium with samples from mangrove habitats in Maowei Sea, Guangxi Beibu Gulf[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2331-2340 (in Chinese)
- [18] 彭志兰, 柳敏海, 郭海波, 罗海忠, 薛超波, 吴益春, 罗海军, 夏枫峰. 一株高效好氧反硝化细菌的分离与鉴定[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(4): 632-639
- Peng ZL, Liu MH, Guo HB, Luo HZ, Xue CB, Wu YC, Luo HJ, Xia FF. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifier[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(4): 632-639 (in Chinese)
- [19] 刘鹏. 一株高效脱氮好氧适盐菌 *Photobacterium* sp. LP 的筛选及生物特性研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2015
- Liu P. Screening and microbial characteristic study of a halophilic aerobic denitrification strain *Photobacterium* sp. LP[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2015 (in Chinese)
- [20] 何媛秋, 李存, 陈柔雯, 崔林青, 田新朋. 不同培养条件对海洋沉积环境细菌的选择性分离[J]. *生物资源*, 2020, 42(5): 540-548
- He YQ, Li C, Chen RW, Cui LQ, Tian XP. Selective isolation of bacteria from marine sedimentary environment by different culture conditions[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 540-548 (in Chinese)
- [21] 李娟, 孙强正, 叶长芸, 徐建国. 不同 16S rDNA 引物对肠道菌群分析差异的比较[J]. *公共卫生与预防医学*, 2010, 21(3): 5-9
- Li J, Sun QZ, Ye CY, Xu JG. Comparison of two sets of universal primers of 16S rDNA by analysis of microbial communities of stool samples[J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2010, 21(3): 5-9 (in Chinese)
- [22] Walsh PS, Metzger DA, Higushi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-13 (April 1991)[J]. *BioTechniques*, 2013, 54(3): 134-139
- [23] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [24] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [25] 赵小惠. 聚球藻中活性化合物的分离及抗菌、抗氧化活性研究[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2013
- Zhao XH. Separation of active compounds from *Synechococcus* sp. and its antibacterial and antioxidative properties[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2013 (in Chinese)
- [26] Zhang JC, Guo Z, Xue ZS, Sun ZH, Zhang MH, Wang LF, Wang GY, Wang F, Xu J, Cao HF, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 1979-1990
- [27] Liu H, Guo XW, Gooneratne R, Lai RF, Zeng C, Zhan

- FB, Wang WM. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24340
- [28] Shnit-Orland M, Sivan A, Kushmaro A. *Shewanella corallii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a Red Sea coral[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 10): 2293-2297
- [29] Azevedo GPR, Paz P, Mattsson HK, Moreira APB, Leomil L, Calegário G, Appolinario L, Vidal L, Silva BS, Tonon L, et al. Genome sequence of *Shewanella corallii* strain A687 isolated from pufferfish (*Sphoeroides spengleri*)[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2020, 43(1): e20180314
- [30] Liu NT, Bauchan GR, Francoeur CB, Shelton DR, Lo YM, Nou X. *Ralstonia insidiosa* serves as bridges in biofilm formation by foodborne pathogens *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. *Food Control*, 2016, 65: 14-20
- [31] Chen JM, Ma ML, Uzal FA, McClane BA. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(1): 96-107
- [32] Tytgat HLP, Nobrega FL, Van Der Oost J, De Vos WM. Bowel biofilms: tipping points between a healthy and compromised gut?[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(1): 17-25
- [33] Asaf S, Numan M, Khan AL, Al-Harrasi A. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(2): 138-152
- [34] Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen[J]. *Virulence*, 2012, 3(3): 243-250
- [35] Ye J, Zhao B, An Q, Huang YS. Nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(17): 2206-2213
- [36] Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3(11): 709-721
- [37] Correia CR, Ferreira ST, Nunes P. *Stenotrophomonas maltophilia*: rare cause of meningitis[J]. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 2014, 56(4): e21-e22
- [38] Smith LD. *Clostridium oceanicum*, sp. nov., a sporeforming anaerobe isolated from marine sediments[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 103(3): 811-813
- [39] Juni E, Heym GA. *Psychrobacter immobilis* Gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986, 36(3): 388-391
- [40] Dang HY, Zhu H, Wang J, Li TG. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the southern Okinawa Trough[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(1): 71-79
- [41] Tropeano M, Coria S, Turjanski A, Cicero D, Bercovich A, Mac Cormack W, Vázquez S. Culturable heterotrophic bacteria from Potter Cove, Antarctica, and their hydrolytic enzymes production[J]. *Polar Research*, 2012, 31(1): 18507
- [42] Gao F, Wu YH, Wang ML. An antagonistic actinomycete for suppression of tobacco brown spot[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22(3): 371-377
- [43] Pai SL, Chong NM, Chen CH. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 68(2): 179-185
- [44] Kokou F, Sasson G, Friedman J, Eyal S, Ovadia O, Harpaz S, Cnaani A, Mizrahi I. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2456-2465
- [45] Shade A, Handelsman J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 4-12
- [46] Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(13): 4596-4601
- [47] Cheesman SE, Neal JT, Mittge E, Seredick BM, Guillemin K. Epithelial cell proliferation in the developing zebrafish intestine is regulated by the Wnt pathway and microbial signaling via Myd88[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(Suppl 1): 4570-4577
- [48] Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(10): 1595-1608
- [49] 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[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(13): 3363-3378
- [50] Navarrete P, Magne F, Mardones P, Riveros M, Opazo R, Suau A, Pochart P, Romero J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 71(1): 148-156
- [51] Nielsen S, Wilkes Walburn J, Vergés A, Thomas T, Egan S. Microbiome patterns across the gastrointestinal tract of the rabbitfish *Siganus fuscescens*[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3317
- [52] Dehler CE, Secombes CJ, Martin SAM. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13877
- [53] Picchiotti S, Fausto AM, Randelli E, Carnevali O, Taddei AR, Buonocore F, Scapigliati G, Abelli L. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 368-376
- [54] Oxley APA, Shipton W, Owens L, McKay D. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(2): 214-223
- [55] Sharifuzzaman SM, Rahman H, Austin DA, Austin B. Properties of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 isolated from fish guts[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(3): 534-542
- [56] Harris JM, Seiderer LJ, Lucas MI. Gut microflora of two saltmarsh detritivore thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*[J]. *Microbial Ecology*, 1991, 21(1): 277-296
- [57] Hovda MB, Fontanillas R, McGurk C, Obach A, Rosnes JT. Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(1): 154-159
- [58] Prieur D, Mevel G, Nicolas J. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment[J]. *Oceanography and Marine Biology*, 1990, 28: 277-352
- [59] Park J, Kim EB. Insights into the gut and skin microbiome of freshwater fish, smelt (*Hypomesus nipponensis*)[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(5): 1798-1806
- [60] Li H, Wu SG, Wirth S, Hao YT, Wang WW, Zou H, Li WX, Wang GT. Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(1): 153-164
- [61] Ye L, Amberg J, Chapman D, Gaikowski M, Liu WT. 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
- [62] Saha S, Roy RN, Sen SK, Ray AK. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes)[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(4): 380-388
- [63] Hu X, Yu JM, Wang CY, Chen H. Cellulolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)[J]. *Forests*, 2014, 5(3): 455-465
- [64] Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. The gut microbiota of marine fish[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 873