

应用高通量测序技术分析北方刺参养殖 池塘环境菌群结构*

窦妍 赵晓伟 丁君 何鹏

(大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

摘要 刺参(*Apostichopus japonicus*)是一种经济价值很高的海珍品,具有很高的药用价值和营养价值,本文采用高通量测序技术分析了大连地区 3 个养殖公司刺参养殖环境中室内养殖池塘水体、室外养殖水体和沉积物中菌群结构特征,9 个样品所得有效序列为 26503—37825 条,可归为 1502—5741 个分类操作单元(OTUs)。研究结果表明:(1)刺参养殖环境中具有较高的菌群多样性,其中 3 个公司的刺参养殖沉积物环境中菌群多样性较其相应公司刺参养殖水环境中菌群多样性高;(2)9 个样品中的细菌可归为 26 个门类,除常见报道的变形菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门、蓝细菌门、酸杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门和放线菌门外,还有 17 个门类的鲜见报道的菌群被检测到;(3)各样品中菌群组成虽有差异,但变形菌门和拟杆菌门为优势菌,约占 50.54%—99.91%。

关键词 刺参;高通量测序;菌群结构

中图分类号 S917.1 doi: 10.11693/hyhz20150300088

刺参(*Apostichopus japonicus*)是一种经济价值很高的海珍品,具有很高的药用价值和营养价值(Bordbar *et al*, 2011; Purcell *et al*, 2012)。国内外海鲜需求的日益增长刺激着中国海水养殖业的快速发展,然而,过去十年间养殖海洋动物疾病的频繁暴发,给养殖业造成毁灭性的失败和巨大的经济损失。细菌通常是传染病的病原体,如在刺参夏眠和户外养殖过程中暴发的腐皮综合症和细菌性溃疡综合症(Wang *et al*, 2005),疾病的频繁暴发已成为阻碍刺参养殖业迅猛发展的一个重要原因(马悦欣等, 2006; Deng *et al*, 2009; Li *et al*, 2010a)。水产养殖环境中细菌群落组成不仅对养殖动物内部菌群有很重要的影响,而且对养殖动物的营养、免疫和抵抗疾病也有重要的作用(Paerl *et al*, 2003; Luo *et al*, 2006)。因此,通过研究刺参养殖环境菌群的结构特点,可以预防细菌性疾病的暴发,对刺参健康养殖具有重要意义。

许多微生物在自然条件下处于共生体系,很难利用传统的培养方法获得纯培养物(Amann *et al*,

1995; Hugenholtz *et al*, 2009),且分离富集培养方法具有很强的选择性,因而该方法不能准确地反映自然状态下微生物群落的真实情况(Rosselló-Mora *et al*, 2001; Auguet *et al*, 2009),这就成为研究刺参菌群结构的一个难题。近几年,随着基于 16S rDNA 扩增子测序的分子生物学的发展,尤其是高通量测序技术的研发及应用,为微生物多样性研究策略注入了新的力量。16S rRNA 扩增子测序通常是选择某个或某几个变异区域,利用保守区设计通用引物进行 PCR 扩增,然后对高变区进行测序分析和菌种鉴定,成为研究环境样品中微生物组成结构的重要手段(Youssef *et al*, 2009; Caporaso *et al*, 2011)。目前关于刺参养殖环境中菌群结构的研究已有报道,如关晓燕等(2010)、王轶南等(2010)、李建光等(2014)都对刺参养殖环境菌群结构进行过报道,但其主要研究方法为 DGGE 技术。DGGE 指纹图谱技术,在其实验结果中往往只含有数十条条带,仅能反映出样品中少数优势菌的信息;且由于分辨率的误差,部分电泳条带中

*国家海洋局海洋公益项目, 201105007-2 号。窦妍, 硕士研究生, E-mail: yandou1989@126.com

通讯作者: 丁君, 硕士生导师, 研究员, E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn

收稿日期: 2015-03-24, 收修改稿日期: 2015-06-15

可能包含不只一种 16S rRNA 序列, 因此要了解电泳图谱中具体的菌种信息, 还需对每一条带构建克隆文库并筛选克隆子进行测序, 此实验操作相对繁琐。下一代高通量测序直接从环境样本中扩增 16S rRNA 序列高变区并进行测序, 能同时对样品中的优势种群及微量菌进行检测, 获得样品中的微生物群落组成, 并将其含量进行数字化分析, 因而被广泛应用于环境样品菌群多样性的研究(Bell *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015)。

辽宁省是我国刺参主要养殖区域之一, 本研究采用基于 Miseq 平台的高通量测序技术对大连地区(普兰店、庄河、旅顺)三个养殖公司的刺参养殖环境(养殖水和沉积物)菌群结构进行了分析, 以期更客观、全面地反映出刺参养殖环境菌群的真实情况, 为刺参健康养殖、疾病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2014 年 10 月—11 月分别对大连地区(普兰店、庄河、旅顺)的三个刺参养殖公司进行样品采集(表 1)。用无菌瓶分别取刺参室内和室外养殖环境水面 40cm 左右处海水 1L, 室外刺参养殖环境底部 2—5cm 处底泥 100g(王轶南等, 2010), 采集样品于冰盒中运送至实验室。

表 1 样品标记信息
Tab.1 Labels of samples

养殖公司	室内养殖 池塘水样	室外养殖 环境水样	室外养殖环境 沉积物样
普兰店养殖公司	DJ1	DJ2	DJ9
庄河养殖公司	DJ5	DJ6	DJ11
旅顺养殖公司	DJ12	DJ13	DJ14

1.2 DNA 提取、扩增和测序

用 0.22 μ m 无菌滤膜对水样进行过滤。水样和底泥样 DNA 分别用 OMEGA 水样 DNA 提取试剂盒(OMEGA Water DNA Kit, D5525)和土壤 DNA 提取试剂盒(OMEGA Soil DNA Kit, D5625)提取。16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增引物为: 341F (5'-CCTACGGGNG GCWGCAG-3')和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTA ATCC-3')。送生工生物工程(上海)股份有限公司进行基于 Illumina Miseq 测序平台的高通量测序。

1.3 数据处理

测序完成后, 对原始数据进行处理, 处理过程如下:

质量控制: (1) 采用 Prinseq 软件(Prinseq-lite 0.19.5)对所得测序序列的 3'端进行质控, 截掉质量低的数据; (2) 通过 Flash 软件(FLASH v1.2.7)融合双末端序列, 并根据 barcode 序列将序列拆分, 各自回归到对应样品; (3) 采用 Prinseq 软件(Prinseq-lite 0.19.5)对各个样品进行去引物序列、短片段、低复杂度序列、低质量序列。

去除嵌合体及非靶区域序列: (1) 采用 Mothur 软件包(Schloss *et al.*, 2009)中的 Pre.cluster 软件进行测序错误校正, 校正过程当中允许的最大错配为 1/150; (2) 以 SILVA 数据库中序列作为模板, 采用 UCHIME (Edgar *et al.*, 2011)软件, 去除数据中的嵌合体。

1.4 多样性和群落结构分析

采用 UCLUST 软件(UCLUST v1.1.579)将序列按照序列相似性为 97%的阈值进行 OTUs 操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)聚类。采用 Mothur 软件对样品序列进行 Alpha 多样性分析, 包括丰富度指数(Richness)、ACE 指数(ACE Index)、Chao1 指数(Chao1 Index)、覆盖率(Coverage)。选择 OTUs 操作单元里的一条代表序列(默认丰度最高)采用 RDP classifier 软件进行物种分类, 分类阈值默认为 0.8。

2 结果与分析

2.1 测序序列处理结果

9 个样品所得原始测序序列为 28977—42115 条, 原始序列上传至 NCBI 的 SRA 数据库, 登录号为 SRP052819。原始序列经质量控制、嵌合体和非靶区域序列去除后, 9 个样品所得有效序列为 26503—37825 条(表 2)。

表 2 9 个样品中序列分析
Tab.2 Analysis of sequence from nine samples

样品号	原始 序列	质控后 序列	非靶区 序列序列	嵌合体 序列	有效 序列
DJ1	41340	41334	12	4441	36881
DJ2	40343	40336	4	2507	37825
DJ9	37490	37487	17	1826	35644
DJ5	38006	38003	0	4647	33356
DJ6	42115	42111	1	5112	36998
DJ11	38453	38453	2	7664	30787
DJ12	28977	28971	4	2464	26503
DJ13	30469	30465	33	2938	27494
DJ14	29102	29098	0	2082	27016

2.2 菌群多样性分析

本研究 9 个样品的有效序列经进一步分析可归

为 1502—5655 个 OTUs (图 1)。9 个样品中 ACE 和 Chao 1 多样性指数分别是 5579—25014 和 3240—15231, 各样品菌群多样性较高。除 DJ9、DJ11、DJ13、DJ14 样品外, 样品 DJ1、DJ2、DJ5、DJ6、DJ12 的稀疏曲线趋于饱和(图 2)。测序样品的覆盖率为 86%—97%, 其中 DJ9、DJ11、DJ13、DJ14 样品覆盖率值较其它样品的覆盖率值低。由多样性指数和稀疏曲线分析, DJ9 样品中的菌群多样性大于 DJ1 和 DJ2, DJ11 样品中的菌群多样性大于 DJ5 和 DJ6, DJ14 样品中的菌群多样性大于 DJ12 和 DJ13, 即各公司刺参养殖环境沉积物中菌群多样性大于其相应公司的刺参养殖水体中菌群多样性。在室外养殖环境水中 DJ13 为未经处理的自然海域中的海水, DJ2 和 DJ6 海水经沉淀和砂滤处理, 因此 DJ13 中菌群多样性大于 DJ6 和 DJ2。

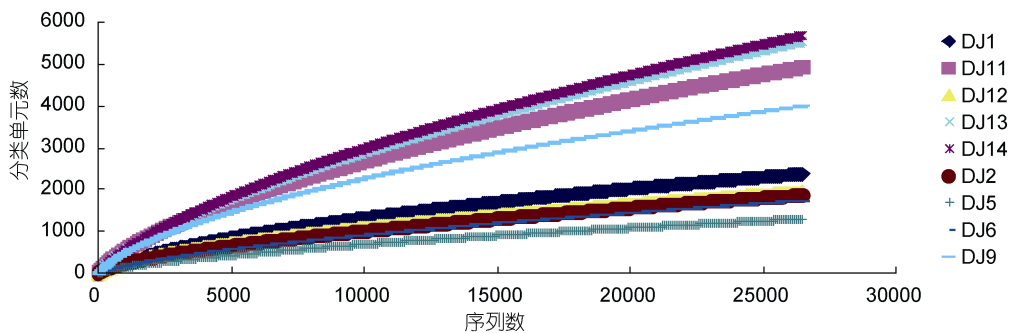


图 2 样品丰富度稀疏分析图
Fig.2 Richness rarefaction plot from all samples

2.3 菌群结构分析

根据分类结果, 9 个样品中检测到的细菌归属于 26 个门类、69 个纲、105 个目、249 个科、890 个属, 主要门类为变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、绿弯菌门 Chloroflexi、浮霉菌门 Planctomycetes、蓝细菌门 Cyanobacteria、酸杆菌门 Acidobacteria、疣微菌门 Verrucomicrobia、厚壁菌门 Firmicutes 和放线菌门 Actinobacteria 等(图 3), 另外 17 个门类的细菌在 9 个样品中的检测量均不足 1%, 主要为嗜热丝菌门 Caldiserica、古细菌 Archaea、柔膜菌门 Tenericutes、纤维杆菌门 Fibrobacteres、互养菌门 Synergistetes、硝化螺旋菌门 Nitrospira、迷踪菌门 Elusimicrobia、装甲菌门 Armatimonadetes、衣原体门 Chlamydiae、异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus、绿菌门 Chlorobi、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、梭杆菌门 Fusobacteria、黏胶球

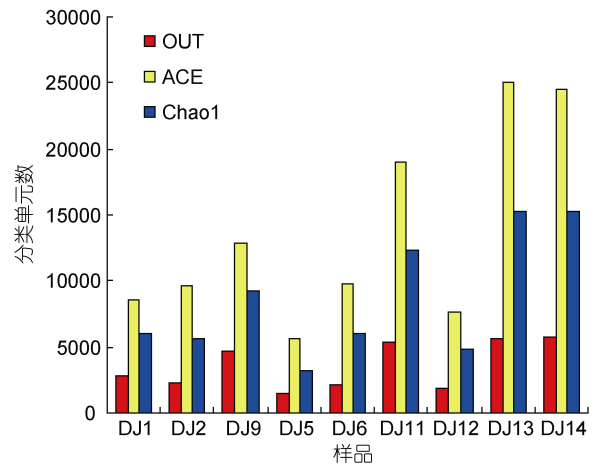


图 1 基于 OUT 的 ACE 和 Chao 1 多样性指数的 Alpha 多样性分析

Fig.1 The Alpha diversity of bacteria associated with samples, and the numbers of OTUs observed and predicted (ACE and Chao 1)

形菌门 Lentisphaerae、产水菌门 Aquificae、脱铁杆菌门 Deferribacteres 和螺旋体门 Spirochaetes 等。DJ1 样品中含有 19 个门类的细菌, 其中优势菌群为拟杆菌门 Bacteroidetes (52.03%), 次优势菌群为变形菌门 Proteobacteria (41.93%); DJ2 样品中含有 18 个门类的菌群, 其优势菌群为变形菌门(63.90%), 次优势菌群为拟杆菌门(24.50%); DJ9 样品中含有的细菌门类最多(21 个门类), 优势菌群为变形菌门(58.05%), 次优势菌群为拟杆菌门(12.20%); DJ5 样品中含有的细菌门类最少(12 个门类), 优势菌群为变形菌门(88.21%), 次优势菌群为拟杆菌门(10.89%); DJ6 样品中含有 15 个门类的细菌, 优势菌群为变形菌门(50.80%), 次优势菌群为拟杆菌门(38.34%); DJ11 样品中含有 20 个门类的细菌, 优势菌群为变形菌门(59.92%), 次优势菌群为拟杆菌门(18.92%); DJ12 样品中含有 15 个门类的细菌, 优势菌群为变形菌门(50.94%), 次优势菌

群为拟杆菌门(46.16%); DJ13 样品中含有 20 个门类的细菌, 优势菌群为变形菌门(68.64%), 次优势菌群为拟杆菌门(13.56%); DJ14 样品中含有 18 个门类的细菌, 优势菌群为蓝细菌门 Cyanobacteria (41.07%),

而变形菌门和拟杆菌门所占比例分别为 36.96%和 13.58%。由此表明, 各样品中含有的菌群组成虽有差异, 但变形菌门和拟杆菌门为优势菌, 在样品中检测到的范围为 50.54%—99.91%。

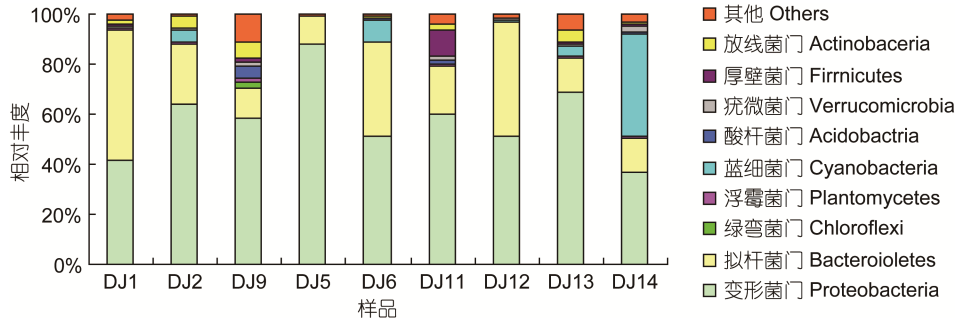


图 3 样品中基于门水平的菌群相对丰度分析

Fig.3 Relative abundance of phylum-level bacterial communities in different samples
其它为未能确定门分类水平及门分类比例较少的门类

不同样品中所含菌群丰度最高的 10 个 OUTs 能够有助于了解样品中所含的主要细菌类型(表 3)。9 个样品中所含菌群丰度最高的 10 个 OTUs 的序列经比对发现主要与变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和蓝细菌门的细菌相似。其中, DJ1 为噬纤维素菌属 *Cellulophaga* (11.34%)、拟杆菌门 Bacteroidetes (8.32%)、极地杆菌属 *Polaribacter* (7.80%—1.24%)、*Glaciecola* (6.66%)、红杆菌科 *Rhodobacteraceae* (3.96%)、*Psychroserpens* (2.59%—1.71%)、变形菌门 Proteobacteria (2.50%)、不动杆菌属 *Acinetobacter* (1.47%); DJ2 为红杆菌科 (11.37%)、*Roseovarius* (7.24%)、黄杆菌科 *Flavobacteriaceae* (6.09%—2.70%)、 γ -变形菌 *Gammaproteobacteria* (3.92%—2.14%)、噬纤维素菌属 (3.18%)、土壤球菌属 *Agrococcus* (2.89%)、 α -变形菌 *Aphlaproteobacteria* (2.33%)、*Nisaea* (2.17%); DJ9 为 *Desulfopila* (6.37%)、 γ -变形菌 (2.68%—1.26%)、*Kofleria* (2.53%)、*Sulfurovum* (1.95%)、细菌 Bacteria (1.82%)、*Pelobacter* (1.69%)、*Bellilinea* (1.47%)、脱硫八叠球菌属 *Desulfosarcina* (1.14%)、*Actibacter* (1.05%); DJ5 为弧菌属 *Vibrio* (59.37%—1.20%)、亚硫酸盐杆菌属 *Sulfitobacter* (3.91%)、噬菌弧菌属 *Bacteriovorax* (2.64%)、极地杆菌属(2.62%)、红杆菌科(2.37%)、*Glaciecola* (2.12%)、黄杆菌目 *Flavobacteriales* (0.91%)、黄杆菌属 *Tenacibaculum* (0.83%); DJ6 为红杆菌科(8.21%—7.81%)、黄杆菌科(5.56%—4.09%)、蓝细菌门 Cyanobacteria (5.27%)、黄杆菌目(5.00%)、

Kordia (4.39%)、*Thalassobacter* (4.29%)、 γ -变形菌 (3.60%); DJ11 为 *Sporacetigenium* (7.31%)、*Desulfopila* (3.34%—0.78%)、*Actibacter* (2.67%)、弧菌属(2.48%)、*Loktanella* (1.84%)、*Haliaea* (0.93%—0.85%)、*Neptunomonas* (0.70%); DJ12 有极地杆菌属(25.48%—1.36%)、弧菌属(23.13%—2.78%)、*Glaciecola* (3.07%)、*Lewinella* (2.95%)、*Phaeobacter* (1.92%)、噬纤维素菌属(1.05%)、*Kordia* (0.84%)、*Thalassomonas* (0.72%); DJ13 有交替单胞菌属 *Alteromonas* (2.63%—1.30%)、*Sedimenticola* (2.54%)、*Euzebya* (2.52%)、*Litoreibacter* (2.50%)、变形菌(1.92%)、 α -变形菌(1.09%)、*Nisaea* (1.03%)、*Glaciecola* (1.03%)、*Thalassobacter* (0.96%); DJ14 为蓝细菌门(6.76%—0.64%)、*Loktanella* (2.17%)、假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* (1.43%)。值得注意的是, 在 DJ5 和 DJ12 样品中弧菌属细菌含量较高, 分别为 59.37%—1.20%和 23.13%—2.78%。

3 讨论

下一代测序技术(Next Generation Sequence, NGS)主要是通过 16S rRNA 基因[细菌和古生菌的分子钟 (Woese, 1987)]分析环境中的群落组成, 能够提供大量的微生物信息, 因而被广泛应用于各种环境微生物的研究。有研究表明, 长序列能够使分类比对更准确(Wang *et al*, 2007)。罗氏 454 焦磷酸测序由于其能够得到相对较长的序列而被应用于许多微生物方面的研究(Herlemann *et al*, 2011; Xia *et al*, 2011)。Illumina 测序平台虽然费用较 454 焦磷酸测序低且能

表 3 各样品中细菌丰度最高的 10 个 OTUs
 Tab.3 Ten most abundant bacterial OTUs in different samples, listed from the most to least abundant

DJ1	DJ2	DJ9	DJ5	DJ6	DJ11	DJ12	DJ13	DJ14
噬纤维素菌(11.34) <i>Cellulophaga</i>	红杆菌科(11.37) Rhodobacteraceae	<i>Desulfopila</i> (6.37)	弧菌属(59.37) <i>Vibrio</i>	红杆菌科(8.21) Rhodobacteraceae	<i>Sporacetigenium</i> (7.31)	极地杆菌属(25.48) <i>Polaribacter</i>	交替单胞菌属(2.63) <i>Alteromonas</i>	蓝细菌门(6.76) Cyanobacteria
拟杆菌门(8.32) Bacteroidetes	<i>Roseovarius</i> (7.24)	γ -变形菌(2.68) Gammaproteobacteria	亚硫酸盐杆菌属 (3.91) <i>Sulfitobacter</i>	红杆菌科(7.81) Rhodobacteraceae	<i>Desulfopila</i> (3.34)	弧菌属(23.13) <i>Vibrio</i>	<i>Sedimenticola</i> (2.54)	蓝细菌门(4.92) Cyanobacteria
极地杆菌属(7.80) <i>Polaribacter</i>	黄杆菌科(6.09) Flavobacteriaceae	<i>Koffleria</i> (2.53)	弧菌属(2.94) <i>Vibrio</i>	黄杆菌科(5.56) Flavobacteriaceae	<i>Acitibacter</i> (2.67)	<i>Glaciecola</i> (3.07)	<i>Eizebya</i> (2.52)	蓝细菌门(3.83) Cyanobacteria
<i>Glaciecola</i> (6.66)	γ -变形菌(3.92) Gammaproteobacteria	<i>Sulfurovum</i> (1.95)	噬菌弧菌属(2.64) Bacteriovorax	蓝细菌门(5.27) Cyanobacteria	弧菌属(2.48) <i>Vibrio</i>	Lewinella (2.95)	Litoreibacter (2.50)	蓝细菌门(3.31) Cyanobacteria
红杆菌科(3.96) Rhodobacteraceae	噬纤维素菌属(3.18) <i>Cellulophaga</i>	细菌(1.82) Bacteria	极地杆菌属(2.62) <i>Polaribacter</i>	黄杆菌目(5.00) Flavobacteriales	<i>Loktanella</i> (1.84)	弧菌属(2.78) <i>Vibrio</i>	变形菌门(1.92) Proteobacteria	蓝细菌门(2.98) Cyanobacteria
<i>Psychroserpens</i> (2.59)	土壤球菌属(2.89) <i>Agrococcus</i>	<i>Pelobacter</i> (1.69)	红杆菌科(2.37) Rhodobacteraceae	黄杆菌科(4.69) Flavobacteriaceae	<i>Halieta</i> (0.93)	<i>Phaobacter</i> (1.92)	交替单胞菌属(1.30) <i>Alteromonas</i>	蓝细菌门(2.56) Cyanobacteria
变形菌门(2.50) Proteobacteria	黄杆菌科(2.70) Flavobacteriaceae	<i>Bellilinea</i> (1.47)	<i>Glaciecola</i> (2.12)	<i>Kordia</i> (4.39)	<i>Halieta</i> (0.86)	极地杆菌属(1.36) <i>Polaribacter</i>	α -变形菌(1.09) Alphaproteobacteria	<i>Loktanella</i> (2.17)
红杆菌科(1.71) Rhodobacteraceae	α -变形菌(2.33) Alphaproteobacteria	γ -变形菌(1.26) Gammaproteobacteria	弧菌属(1.20) <i>Vibrio</i>	<i>Thalassobacter</i> (4.29)	<i>Halieta</i> (0.85)	<i>Cellulophaga</i> (1.05)	Nisaea (1.03)	蓝细菌门(1.82) Cyanobacteria
<i>Acinetobacter</i> (1.47)	<i>Nisaea</i> (2.17)	脱硫八叠球菌属 (1.14) <i>Desulfosarcina</i>	黄杆菌目(0.91) Flavobacteriales	Flavobacteriaceae (4.09)	<i>Desulfopila</i> (0.78)	<i>Kordia</i> (0.84)	<i>Glaciecola</i> (1.03)	假交替单胞菌属 (1.43) <i>Pseudoalteromonas</i>
极地杆菌属(1.24) <i>Polaribacter</i>	γ -变形菌(2.14) Gammaproteobacteria	<i>Actibacter</i> (1.05)	黄杆菌属(0.83) <i>Tenacibaculum</i>	γ -变形菌(3.60) Gammaproteobacteria	Neptunomonas (0.70)	<i>Thalassomonas</i> (0.72)	<i>Thalassobacter</i> (0.96)	蓝细菌门(0.64) Cyanobacteria

括号内为各类群的相对丰度(%)

够产生大量序列,但是由于得到的序列较短限制了其在微生物群落研究中的应用。然而,近年来 Illumina 测序平台逐渐提高了其测序性能,利用序列延伸法克服了所测序列较短的缺陷。目前,应用 Illumina Miseq 测序能够得到 250bp 或 300bp 左右的碱基长度的序列(Jeon *et al*, 2015),使得该测序技术逐渐应用于微生物群落的研究(Bell *et al*, 2013; Yang *et al*, 2015)。本研究利用基于 Illumina Miseq 平台的高通量测序分析了大连地区 3 个养殖公司的刺参养殖环境菌群多样性,9 个样品所得有效序列为 26503—37825 条,可归为 1502—5741 个分类操作单元(OTUs),进一步分析表明样品 9 个样品中除检测以往报道过的刺参养殖环境中的细菌变形菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门、蓝细菌门、酸杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门和放线菌门(Li *et al*, 2010; 王轶南等, 2010; 关晓燕等, 2010; 李建光等, 2014)外,还检测到嗜热丝菌门、古细菌、柔膜菌门、纤维杆菌门、互养菌门、硝化螺旋菌门、迷踪菌门、装甲菌门、衣原体门、异常球菌-栖热菌门、绿菌门、芽单胞菌门、梭杆菌门、黏胶球形菌门、产水菌门、脱铁杆菌门和螺旋体门等 17 个鲜见报道的类群,其在 9 个样品中的检测量均不足 1%,表明基于 Illumina Miseq 平台的高通量测序可作为全面了解环境中菌群多样性的一种有效研究手段。

多样性指数和稀缺性曲线进一步分析,3 个公司的刺参养殖环境沉积物中群落多样性较其刺参养殖水环境中菌群多样性高。与 Lozupone 等(2007)的研究结果即沉积物中微生物多样性较其它环境类型中微生物多样性较高相一致。本研究结果显示变形菌门和拟杆菌门为各样品的优势菌。变形菌门类的细菌在刺参养殖环境中普遍存在(Li *et al*, 2010b; 任利华等, 2015)。本研究各样品中的变形菌主要为 γ -变形菌和 α -变形菌。 γ -变形菌中主要包括 *Glaciecola* 属、不动杆菌属、弧菌属、单胞菌属等。 γ -变形菌是海洋中普遍存在的细菌,多样性很高,数量也很大,尤其在营养物质含量高的水域,都是主要的优势细菌,大多数都能够培养(Ivanova *et al*, 2003; Payne *et al*, 2006)。通常在厌氧环境中,部分 γ -变形菌可与该环境中的动物形成共生关系,对环境中的碳、硫循环起着重要作用(Bakunina *et al*, 1999; Huber *et al*, 2004)。 α -变形菌主要属于红细菌目、红细菌科的细菌,这类细菌能够通过光合作用进行生长代谢,CO₂ 和氮的固定(白洁等, 2009),因此在刺参养殖环境系统碳、氮循环中发挥着

重要作用。拟杆菌门的细菌与 DNA、脂类和蛋白质等有机物质的转换密切相关,这些有机物质的吸收和利用是各种水体环境中碳循环的重要组成部分(Cottrell *et al*, 2000; O'Sullivan *et al*, 2002)。在养殖过程中,对刺参进行喂食的有机饲料,未被完全消化的饲料、粪便在水体中未能及时被分解,便会沉积下来(吴庆龙等, 1995),会造成池底拟杆菌细菌含量增加(Rosselló-Mora *et al*, 1999)。3 个公司刺参养殖环境水体和沉积物中都发现了该类群的细菌,这说明这些养殖环境中存在着较为活跃的物质循环。此外,蓝细菌是海洋生态系统和初级生产力的重要组成部分,能通过同化 CO₂ 来生成 O₂, 在好氧条件下固氮,在黑暗中通过厌氧呼吸来还原硫(白洁等, 2009),在水样和沉积物样品中均检测到蓝细菌的存在,尤其是旅顺养殖公司的刺参底播养殖沉积物(DJ14)中蓝细菌占 41.07%。

近年来,关于弧菌引起的刺参病害的研究时常报道。张春云等(2006)和杨求华等(2014)从患有“腐皮综合症”的刺参病灶处分离的致病菌分别为灿烂弧菌 *V. splendidus* 和塔式弧菌 *V. tubiashii*, 腐皮综合症发病急,病程短,死亡率高是刺参幼参和成参时期危害最为严重的疾病(张鹏等, 2013)。王印庚等(2007)在仿刺参苗种培育期间从患“烂胃病”的耳状幼体中分离到 1 株细菌,鉴定为灿烂弧菌并视为耳状幼体“烂胃病”的致病原之一。杨嘉龙等(2007)从患“溃疡病”的仿刺参病灶处分离的致病菌被鉴定为溶藻弧菌 *V. alginolyticus*。马悦欣等(2006)从患急性口围肿胀症的刺参的口围、体表和呼吸树中分离得到的优势菌经人工感染试验证实,五株引起溃烂病的病原菌中有四株属于弧菌属。Deng 等(2009)从患有“腐皮综合症”的刺参体表和排脏中分离纯化得到 8 株优势菌,经研究为致病菌,进一步鉴定分别为弧菌属、发光杆菌属 *Photobacterium*、节杆菌属 *Arthrobacter*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 的细菌,其中有 4 株为弧菌。弧菌属虽是正常菌属的一部分,但是在某些特殊条件发生,如刺参受到应激影响或体表损伤时,会迅速感染刺参(Thompson *et al*, 2004; Thompson *et al*, 2005)。本研究中,庄河和旅顺养殖公司的室内养殖池塘中检测有大量的弧菌属的细菌,虽然两养殖公司的刺参未有疾病的暴发,但是为了养殖刺参的健康生长,应注意刺参养殖加强管理,观察刺参活动状态,摄食与粪便情况,保持池底清洁,定时测量水质指标。

4 结论

刺参养殖作为我国水产养殖的重要产业和北方地区养殖结构调整的优良水产品种,具有较高的经济效益和发展潜力。近年来海参疾病的发生波及范围广,死亡率高且有连年加重之势,病害的泛滥成为制约其发展的主要限制因素之一,因此解决当前病害问题成为一种迫切的市场需求。

目前关于刺参养殖环境中菌群结构的研究已有报道,前文已作阐述。病害的发展是一个复杂的过程,微生物群落在这一过程中数量和结构也在不断变化,与刺参的健康状况紧密相关。本研究采用高通量测序技术分析大连地区 3 个养殖公司刺参养殖环境中室内养殖池塘水体、室外养殖水体和沉积物中菌群结构特征,揭示了刺参池塘养殖环境中的菌群多样性和丰度,比较了其菌群结构及差异,为刺参健康养殖提供参考。

参 考 文 献

- 马悦欣,徐高蓉,张恩鹏等,2006. 仿刺参幼参急性口围肿胀症的细菌性病原. 水产学报, 30(3): 377—382
- 王印庚,孙素凤,荣小军,2007. 仿刺参幼体烂胃病及其致病原鉴定. 中国水产科学, 13(6): 908—916
- 王轶南,朱世伟,常亚青,2010. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. 渔业科学进展, 31(3): 119—122
- 白洁,李海艳,赵阳国,2009. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征. 微生物学报, 49(3): 343—350
- 任利华,李斌,孙国华等,2015. 16S rDNA 克隆文库解析仿刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种培育池中生物絮团的细菌群落结构. 海洋与湖沼, 46(1): 197—205
- 关晓燕,周遵春,陈仲等,2010. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. 海洋湖沼通报, (1): 82—88
- 李建光,徐永平,李晓宇等,2014. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. 水产科学, 33(9): 562—568
- 杨求华,葛辉,方旅平等,2014. 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定. 南方水产科学, 10(4): 45—51
- 杨嘉龙,周丽,绳秀珍等,2007. 养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析. 水产学报, 31(4): 504—511
- 吴庆龙,陈开宁,高光等,1995. 大水面网围精养对水环境的影响及其对策. 水产学报, 19(4): 343—349
- 张鹏,李成华,李晔等,2013. 刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合症发生相关蛋白的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 44(3): 741—746
- 张春云,王印庚,荣小军等,2006. 养殖刺参腐皮综合症病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 30(1): 118—123
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59(1): 143—169
- Auguet J-C, Barberan A, Casamayor E O, 2009. Global ecological patterns in uncultured Archaea. The International Society for Microbial Ecology Journal, 4(2): 182—190
- Bakunina I, Shevchenko L S, Nedashkovskaia O I *et al*, 1999. Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases. Mikrobiologiya, 69(3): 370—376
- Bell T H, Yergeau E, Maynard C *et al*, 2013. Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. The International Society for Microbial Ecology Journal, 7(6): 1200—1210
- Bordbar S, Anwar F, Saari N, 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—A review. Marine Drugs, 9(12): 1761—1805
- Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A *et al*, 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(S1): 4516—4522
- Cottrell M T, Kirchman D L, 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. Applied and Environmental Microbiology, 66(4): 1692—1697
- Deng H, He C B, Zhou Z C *et al*, 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Aquaculture, 287(1—2): 18—27
- Edgar R C, Haas B J, Clemente J C *et al*, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27(16): 2194—2200
- Herlemann D P, Labrenz M, Jürgens K *et al*, 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The International Society for Microbial Ecology Journal, 5(10): 1571—1579
- Huber I, Spanggaard B, Appel K F *et al*, 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 96(1): 117—132
- Hugenholtz P, Hooper S D, Kyrpides N C, 2009. Focus: *Synergistetes*. Environmental Microbiology, 11(6): 1327—1329
- Ivanova E P, Sawabe T, Zhukova N V *et al*, 2003. Occurrence and diversity of mesophilic *Shewanella* strains isolated from the North-West Pacific Ocean. Systematic and Applied Microbiology, 26(2): 293—301
- Jeon Y-S, Park S-C, Lim J *et al*, 2015. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina Miseq platform. Journal of Microbiology, 53(1): 60—69
- Li H, Qiao G, Li Q *et al*, 2010a. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Journal of Fish Diseases, 33(11): 865—877
- Li Q F, Zhang Y, Juck D *et al*, 2010b. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and

- PCR-DGGE. *Aquaculture International*, 18(6): 977—990
- Luzopone C A, Knight R, 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27): 11436—11440
- Luo P, Hu C Q, Xie Z Y *et al*, 2006. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system. *Journal of Tropical Oceanography*, 25(2): 49—53
- O'Sullivan L A, Weightman A J, Fry J C, 2002. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 201—210
- Paerl H W, Dyble J, Moisaner P H *et al*, 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(3): 233—246
- Payne M S, Hall M R, Bannister R *et al*, 2006. Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster (*Panulirus ornatus*). *Aquaculture*, 258(1—4): 80—90
- Purcell S W, Hair C A, Mills D J, 2012. Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368—369: 68—81
- Ren G D, Ren W J, Teng Y T *et al*, 2015. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. *Frontiers in Microbiology*, 6: 22
- Rosselló-Mora R, Aman R, 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1): 39—67
- Rosselló-Mora R, Thamdrup B, Schäfer H *et al*, 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(2): 237—248
- Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T *et al*, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537—7541
- Thompson F L, Iida T, Swings J, 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3): 403—431
- Thompson J R, Pacocha S, Pharino C *et al*, 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307(5713): 1311—1313
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M *et al*, 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261—5267
- Wang Y G, Zhang C Y, Rong X J *et al*, 2005. Diseases of cultured sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, in China. *FAO Fisheries Technical Paper*, 297—310
- Woese C R, 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2): 221—271
- Xia W W, Zhang C X, Zeng X W *et al*, 2011. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 5(7): 1226—1236
- Yang Y Y, Wang Z, He T *et al*, 2015. Sediment Bacterial Communities Associated with Anaerobic Biodegradation of Bisphenol A. *Microbial Ecology*, 70(1): 97—104
- Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R *et al*, 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16): 5227—5236

APPLICATION OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING FOR ANALYZING BACTERIAL COMMUNITIES IN EARTHEN PONDS OF SEA CUCUMBER AQUACULTURE IN NORTHERN CHINA

DOU Yan, ZHAO Xiao-Wei, DING Jun, HE Peng

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract Sea cucumber *Apostichopus japonicus* has become an economically valuable holothurian species because of their anti-tumor properties and good nutritional values. We applied high-throughput sequencing to explore bacterial community in earthen aquaculture ponds of the sea cucumber in Dalian, North China. For nine samples collected, the number of effective sequences ranged 26503—37825, and they could be classified into 1502—5741 operational taxonomic units. Results show great bacterial diversities in the aquaculture. The estimated richness and diversity indices were higher in sediment samples than those in water samples. In total, 26 phyla were identified, among which Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Cyanobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, and Actinobacteria were commonly reported, and other 17 were firstly detected and rarely reported. Despite the differences in microbe composition, Proteobacteria and Bacteroidetes (50.54%—99.91%) were the dominant phyla in all samples.

Key words sea cucumber *Apostichopus japonicus*; high-throughput sequencing; bacterial communities