

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道菌群的 地域性差异与共性研究*

柴英辉¹ 高菲² 王金锋³ 周文礼¹

(1. 天津农学院水产学院 天津 300384; 2. 海南大学海洋学院 海口 570228; 3. 中国科学院北京生命科学研究院 北京 100101)

摘要 作为高附加值水产养殖物种,仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的病害和病原微生物研究受到人们关注,但对其共生菌群组成、地域性差异及与水体环境间交流等方面的研究仍十分有限。本研究收集了来自中国、日本和韩国共 786 例仿刺参肠道、水体和沉积物的 16S rRNA 基因高通量测序数据,比较细菌群落组成以探寻仿刺参肠道微生物与环境 and 地域之间的关系。分析结果显示,尽管仿刺参肠道、水体和沉积物中各细菌组分的比例不同,但共有菌属甚多,表明仿刺参可以从外界环境大量获取微生物。与水体和沉积物的样本类型相比,仿刺参肠道微生物多样性最低且所含菌属的种类最少,进一步提示仿刺参肠道对外界来源的微生物进行了富集和筛选,其中变形细菌门(Proteobacteria)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和利斯顿氏菌属(*Listonella*)的富集尤为明显。中国、日本和韩国来源的仿刺参肠道微生物 Alpha 多样性无显著差异,但主坐标分析将它们聚为不同的簇,且各自拥有独特的细菌门类。比较中国渤海和黄海两个海区的仿刺参肠道菌群获得了相似的结果,体现出广泛的地域性差异。基于细菌分类的功能预测发现三个国家仿刺参肠道微生物均具有发酵、化能异养和需氧化能异养功能,表明共生菌群在功能上存在共性,并可能对宿主生理产生相同的作用。本研究揭示了仿刺参肠道微生物在不同地域之间存在明显差异,并且与水体环境之间存在着密切的联系,能够为仿刺参共生微生物及其与宿主健康的相关性研究提供基础性资料,并可能在自然循环过程和渔业资源保护过程中发挥作用。

关键词 仿刺参; 肠道; 海水; 沉积物; 微生物组; 地域

中图分类号 Q938 doi: 10.11693/hyhz20190200044

海参属于棘皮动物门海参纲,是一类特殊的海洋无脊椎动物(Wang *et al.*, 2018)。由于营养价值高、富含多种生物活性成分(Mashjoor *et al.*, 2017),海参在亚洲作为一种传统的保健食品已有上千年的食用历史(Zhu *et al.*, 2018)。目前海参已成为世界范围内一种常见的、具有较高经济价值的海产品,其水产养殖业也在不断扩大(Jo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019)。仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)是海参中重要的养殖种类,在中国、日本和韩国地区都有大规

模培育,在我国主要分布于辽宁、河北、山东和江苏沿海等水域(Wang *et al.*, 2015)。在过去十几年的渔业发展中,仿刺参已由传统的小规模食用养殖,慢慢转变成区域、国家和国际的产业化格局(Conand, 2018)。

肠道菌群结构以及微生物互作被认为对维持宿主健康非常关键,菌群稳态以及微生物群落与宿主之间的有益交流,在人体和模式动物中的研究较为深入(Endesfelder *et al.*, 2014; Coyte *et al.*, 2015)。水生

* 中国科学院重点部署项目, KFZD-SW-219 号; 国家自然科学基金项目, 41766005 号; 海南大学科研启动基金资助项目, KYQD(ZR)1703 号。柴英辉, 硕士研究生, E-mail: yinghuichai@126.com

通信作者: 周文礼, 研究生导师, 研究员, E-mail: wenlizhou@tjau.edu.cn

收稿日期: 2019-02-28, 收修改稿日期: 2019-05-31

动物虽然不及人体和模式动物的研究深入,但同样被发现有着复杂的肠道微生物群落(Ratana- Arporn *et al.*, 2014)。水生动物肠道共生菌群与宿主之间也存在着密切的联系,正常状态下物种组成和丰度相对稳定,被认为是宿主的重要组成部分(O'Hara *et al.*, 2006),不仅决定了食物中复杂分子的分解情况(Fava *et al.*, 2019),还对宿主的发育、免疫和营养状态具有调节作用(Chi *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016)。目前有许多研究尝试将益生菌应用于鱼虾养殖之中,均取得了良好的效果(Chi *et al.*, 2014; Lazado *et al.*, 2014; Hai, 2015; Banerjee *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2017; Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2019)。仿刺参消化系统独特,体腔中只有一根简单的肠,具有移动缓慢、体积大、便于解剖、寿命长、分布广泛等特点,是研究水生动物肠道微生物群进化和功能的最佳选择(Tunca *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017)。有实验报道从仿刺参肠道分离出少量的细菌菌株,并通过测序获得了基因组信息(Hong *et al.*, 2017; Jo *et al.*, 2017)。另有多项研究分别对中国、日本和韩国海域的仿刺参肠道微生物进行了高通量测序(Yamazaki *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Bronstein *et al.*, 2018),为研究水生动物共生微生物提供了宝贵的数据,但是仿刺参肠道微生物群落的地域差异和共性以及潜在的功能鲜有报道,对仿刺参益生菌的研究也还处于实验起步阶段(Chen *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019)。

为了理解仿刺参肠道微生物群落的生态稳定性,本研究通过对不同地域的仿刺参肠道、海水和沉积物微生物组进行生物信息学分析,揭示仿刺参肠道微生物地域性差异和共性,以及与水体环境之间的联系,以期为仿刺参共生微生物及其与宿主健康的相关性研究提供基础性资料,更好地推动水产养殖业和渔业的发展。

1 材料与方法

1.1 数据来源

从 NCBI-SRA 数据库中,对 2000—2018 年公开发表的 16S rRNA 高通量测序数据进行检索,收集到中国仿刺参肠道样本数据 42 例,日本仿刺参肠道样本数据 20 例,韩国仿刺参肠道样本数据 64 例。作为比较同时下载了绿海胆(*Lytechinus variegatus*)肠道样本数据 20 例,海水样本数据 381 例和沉积物样本数据 94 例(表 1)。

1.2 分析方法

1.2.1 OTU 识别和物种注释 使用 FLASH 软件及默认参数对 16S rRNA 双端读段进行对接获得长序列(Magoč *et al.*, 2011)。去除带有 N 的对接序列,剩余序列做切除引物处理,并将序列转化成 fasta 格式以便于后续分析。运用 Qiime 软件对数据进行分析(Huang *et al.*, 2014),默认以 97% 的序列相似度聚类得到 OTU (operational taxonomic unit),即可操作分类单元,并基于 Greengenes 数据库对 OTU 进行物种注释获得分类信息表(Quast *et al.*, 2013)。

1.2.2 多样性分析 统计分析和图形化过程使用 R 语言进行。运用 CSS 标准化 OTU 丰度,使用 vegan 包计算 Shannon 多样性指数;使用 optparse、metagenomeSeq、biom 包计算 Bray-Curtis 距离得到组间 Beta 多样性。

1.2.3 细菌共现性分析 利用 SparCC 的方法,基于所有仿刺参肠道样本的丰度信息计算菌属相关性,阈值设置为 $P < 0.05$ 、相关性系数大于 0.5,并使用 Gephi 软件绘制共存关系网络图(Wang *et al.*, 2016)。

1.2.4 功能预测 使用 FAPROTAX 软件(1.1 版本)进行功能预测(Louca *et al.*, 2016)。FAPROTAX 软件包含一个基于已验证的可培养菌信息构建的物种分类与功能注释数据库,将 OTU 分类表与该数据库进行关联,以推测各物种携带的功能及其丰度,得到微生物群落功能注释预测结果。

1.2.5 聚类分析 使用 ggplots 和 pheatmap 包,基于菌属丰度计算肠道、海水和沉积物样本 Pearson 系数后进行聚类,分析微生物群落相似性(Gao *et al.*, 2016);基于预测的代谢功能对中国、日本和韩国样本进行聚类并绘制热图。

1.2.6 多组间比较 使用 plyr、scales 和 grid、VennDiagram 包计算组间共有与差异菌属(Roux *et al.*, 2016);使用 Galaxy 平台进行 LefSe (linear discriminant analysis effect size)分析,识别分组代表性菌属(Giardine *et al.*, 2005);使用 Calypso 平台进行菌属 OddsRatio 分析(Zakrzewski *et al.*, 2017)。使用 Wilcoxon 秩和检验统计组间的差异显著程度。

2 结果

2.1 仿刺参肠道微生物与水环境的比较

本研究在 97% 序列相似性的阈值下从所有样本中共识别出 16383 个 OTUs。基于 OTU 数据计算各样本的 Alpha 多样性,结果显示仿刺参肠道微生物多

表 1 用于本研究的样本信息
Tab.1 Sample information for this study

项目编号	物种	地域	肠道	海水	沉积物	测序平台	16S rRNA	坐标	采集时间	提交机构
PRJNA430504	仿刺参	渤海	30	-	-	Illumina	V4	未知	2017/3/20	烟台大学
PRJNA337986	仿刺参	黄海	12	-	6	Illumina	V3-V4	未知	2014/11	中国海洋大学水产学院
PRJDB4366	仿刺参	日本	20	1	-	454	V1-V2	42.13N, 140E	2017/8	北海道大学(Yamazaki <i>et al.</i> , 2016)
PRJEB21905	仿刺参	韩国	64	-	-	Illumina	V1-V3	37.89N, 127.74E	2016/8-11	翰林大学(Kim <i>et al.</i> , 2017)
PRJNA326427	绿海胆	美国	12	3	-	Illumina	V4	29.8N, 85.36W	2014/10	阿拉巴马大学伯明翰分校(Bronstein <i>et al.</i> , 2018)
PRJNA291441	绿海胆	美国	8	1	-	Illumina	V4	29.8N, 85.36W	2013/4	阿拉巴马大学伯明翰分校
PRJNA486858	海水	南海	-	30	-	Illumina	V3-V4	22.61N, 114.56E	2017/7/28	中国科学院南海海洋研究所
PRJNA387529	海水	东海	-	67	-	Illumina	V5-V6	26N, 120.56E	2014/10/2	国立台湾大学
PRJNA316898	海水	南海	-	25	-	454	V4	20.76N, 119.8E	2013/4	同济大学
PRJDB3905	海水	东海	-	49	-	454	V4-V5	29.87N, 121.89E	2012/12/12	中国科学院土壤科学研究所
PRJNA358780	海水	东海	-	8	-	Illumina	V4-V5	30.2N, 122.69E	2016/1/4	浙江海洋大学
PRJNA427864	海水	渤海	-	12	-	Illumina	V4-V5	37.75N, 120.106E	2015/8/17	中国科学院烟台海岸带研究所
PRJNA389159	海水	南海	-	24	-	Illumina	V3-V4	未知	2014/6	山东大学
PRJNA418051	海水	渤海	-	10	-	Illumina	V4	39.36N, 119.45E	2016/5/12	中国环境科学研究院
PRJNA336443	海水	南海	-	23	-	454	V1-V3	15.14N, 113E	2012/10/9	中国海洋大学
PRJDB4992	海水	东海	-	105	-	Illumina	V4	29.54N, 121.76E	2015/4/15	宁波大学
PRJNA284317	海水	南海	-	12	-	454	V4	22.34N, 114.30E	2013/8	香港科技大学
PRJNA449229	海水	东海	-	11	-	Illumina	V4-V5	28.14N, 127.12E	2015/10	中国海洋大学
PRJNA378681	沉积物	渤海	-	-	37	454	V4	38.16N, 122.48E	2012/5/14	中国科学院烟台海岸带研究所
PRJNA214261	沉积物	渤海	-	-	32	Illumina	V5-V6	未知	2011/5/1	大连海洋大学
PRJNA328063	沉积物	南海	-	-	19	Illumina	V4-V5	未知	2013/5/6	华东师范大学

样性显著低于($P < 0.05$)海水和沉积物中的微生物多样性(图 1a), 其中以沉积物中的多样性最高, 主要原因可能在于沉积物中不仅包含了水体开放环境的微生物, 还包括了其它水生动物的排泄物和水生植物沉

积的微生物。在同样基于 OTU 数据的样本聚类结果中发现, 所有仿刺参肠道样本均与海水样本首先聚集(图 1b), 并且这些海水样本大多来自于渤海。鉴于许多沉积物样本同样取自渤海, 但并未与仿刺参肠道

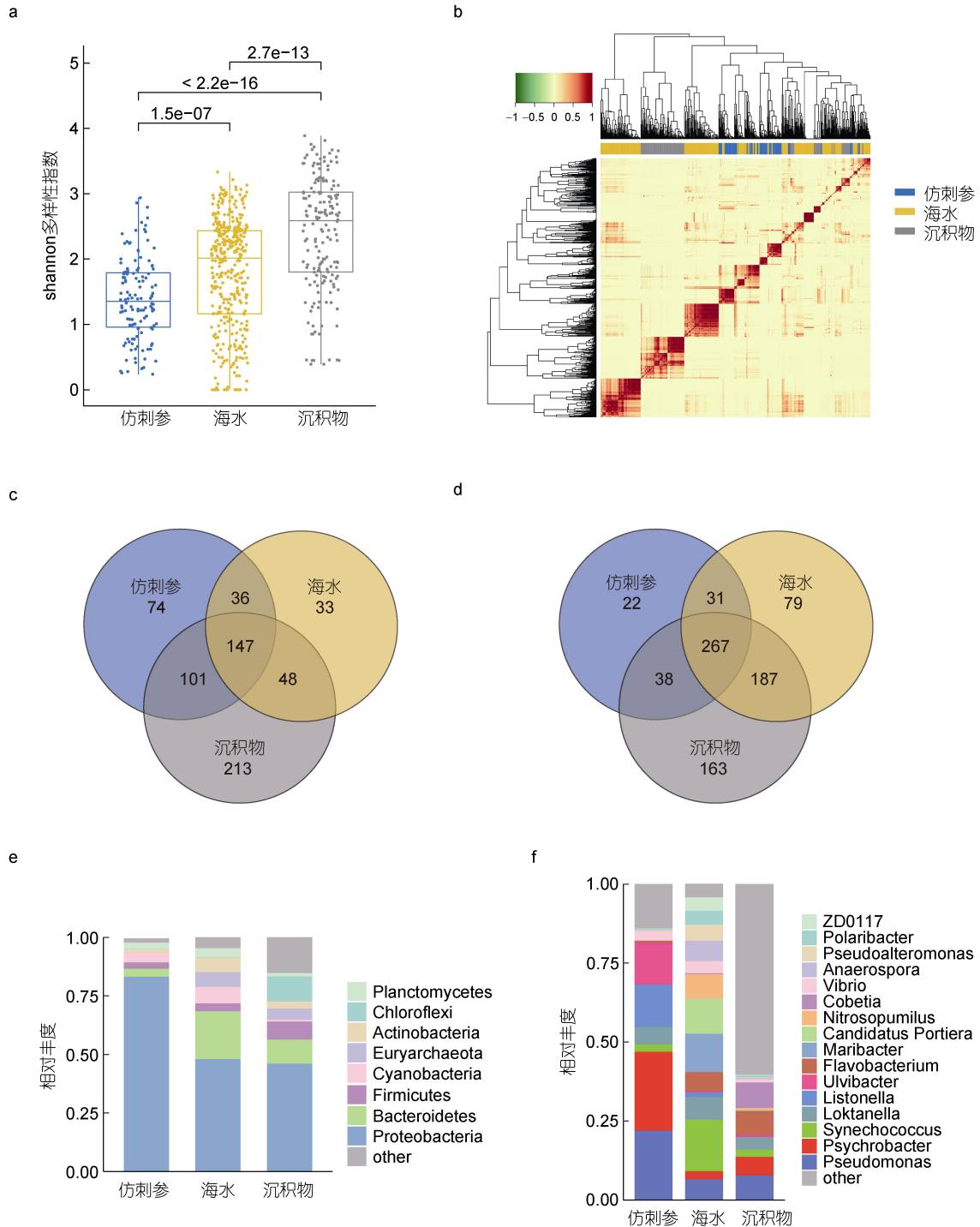


图 1 仿刺参肠道微生物与外界环境的联系

Fig.1 Relationship between intestinal microorganisms and external environment of *A. japonicus*

注: a. 仿刺参肠道、海水、沉积物菌群的 Alpha 多样性; b. 仿刺参肠道、海水和沉积物菌群结构相关性, 基于细菌丰度计算 Pearson 系数后进行聚类; c. 仿刺参肠道与黄海和渤海海水、沉积物共有和独有菌属; d. 仿刺参肠道、海水和沉积物(渤海、黄海、东海和南海)样本中共有和独有菌属; e. 仿刺参肠道、海水和沉积物优势细菌在门水平的比较; f. 仿刺参肠道、海水和沉积物优势菌属的比较

样本首先形成聚类关系,提示仿刺参肠道菌群与海水较为相似,而与沉积物差异相对较大。

对识别的 OTU 进行分类注释,并从细菌属水平上将仿刺参肠道样品与其地理位置较近的黄海和渤海的海水及沉积物进行比较(图 1c),发现仿刺参肠道微生物独有菌属远低于共有菌属数量(74 : 284),且三种样本类型共有的比例较高。为进一步揭示仿刺参肠道微生物与海洋环境之间的关系,添加了东海、南海水域的海水及沉积物样本,仿刺参肠道独有菌属数量减少至 22 个(图 1d),而与海水和沉积物三者共有菌属的数量由 147 个(图 1c)增加到四个海区的 267 个,表明随着取样范围的扩大及识别菌属数量的增多,其与水体环境间可能存在更加广泛的交流。

分别统计仿刺参肠道、海水和沉淀中相对丰度较高的在微生物类群(图 1e-f),发现优势菌在三类样本中的组分十分相似,主要是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和蓝细菌门(Cyanobacteria)等。但与环境样本相比,仿刺参肠道菌群中的变形细菌增多以及拟杆菌减少较为显

著;在属水平上假单胞菌属(*Pseudomonas*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和利斯顿氏菌属(*Listonella*)等的富集尤为明显($P < 0.05$),提示仿刺参在生长过程中会在体内对外界环境来源的微生物进行选择性的富集,维持自身微生物的动态平衡并满足自身的生长需求。

2.2 仿刺参肠道微生物与绿海胆的异同

为了更加深入地认识仿刺参肠道菌群特征,本研究将其与其它棘皮动物绿海胆进行了比较,结果发现仿刺参肠道微生物多样性显著低于($P = 0.0024$)绿海胆(图 2a)。两种棘皮动物的肠道微生物群落结构也明显不同,主成分分析将它们分为了不同的两簇(图 2b)。在两种动物肠道菌群的分组中,假单胞菌属、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、*Octadecabacte*、褐杆菌属(*Phaeobacter*)、陆丹氏菌属(*Loktanella*)和弧菌属(*Vibrio*)的贡献度较大。其中假单胞菌属在仿刺参与海水和沉积物样本的比较中,同样显示出富集的效果,提示高丰度的该菌或可作为仿刺参的特征菌属,用于与环境样本及其它棘皮动物菌群进行区分。

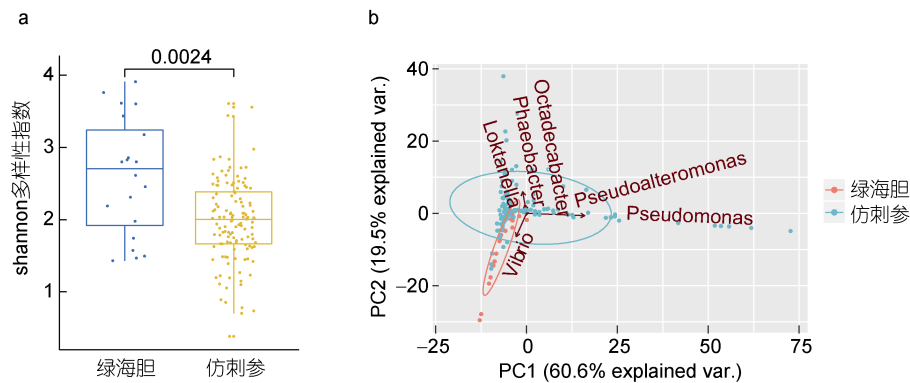


图 2 仿刺参与绿海胆肠道微生物的比较

Fig.2 Comparison in intestinal microorganism between *Apostichopus japonicus* and *L. variegatus*

注: a. 绿海胆与仿刺参肠道菌群的 Alpha 多样性; b. 仿刺参与绿海胆肠道菌群的主成分分析,基于两组中的优势分组菌属

2.3 不同国家仿刺参肠道微生物群落分析

对来自中国的 42 个、日本的 20 个和韩国的 64 个仿刺参肠道样本进行比较,仿刺参肠道微生物 Alpha 多样性无显著差异(图 3a),但是三个国家仿刺参肠道菌群结构各不相同(图 3b)。中国、日本和韩国仿刺参肠道微生物分别识别出 299 个、37 个和 139 个菌属,三个国家仿刺参肠道微生物共有菌属 46 个(图 3c)。尽管韩国来源的样本具有最大的样本量,但来自中国的仿刺参肠道样本拥有最多的菌属数量,表明样本量并非是决定肠道菌群中可识别微

生物种类多少的根本因素,而地理分布不同引起的水文、环境本底和海参摄食习性等因素的不同都可能是产生仿刺参肠道菌群地域间差异和聚簇效果的原因。

通过 LEfSe 分析得到三个国家仿刺参肠道显著差异的细菌,同样体现出不同地域间的明显区别。其中中国的仿刺参肠道微生物特征菌为丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*)和陆丹氏菌属等;日本的仿刺参肠道微生物为黄杆菌目(*Flavobacteriales*)、黄杆菌科

(Flavobacteriaceae)和弧菌属等;而韩国仿刺参肠道的特征微生物类别为鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales)、微

杆菌科(Microbacteriaceae)和微球菌科(Micrococcaceae)等(图 3d)。

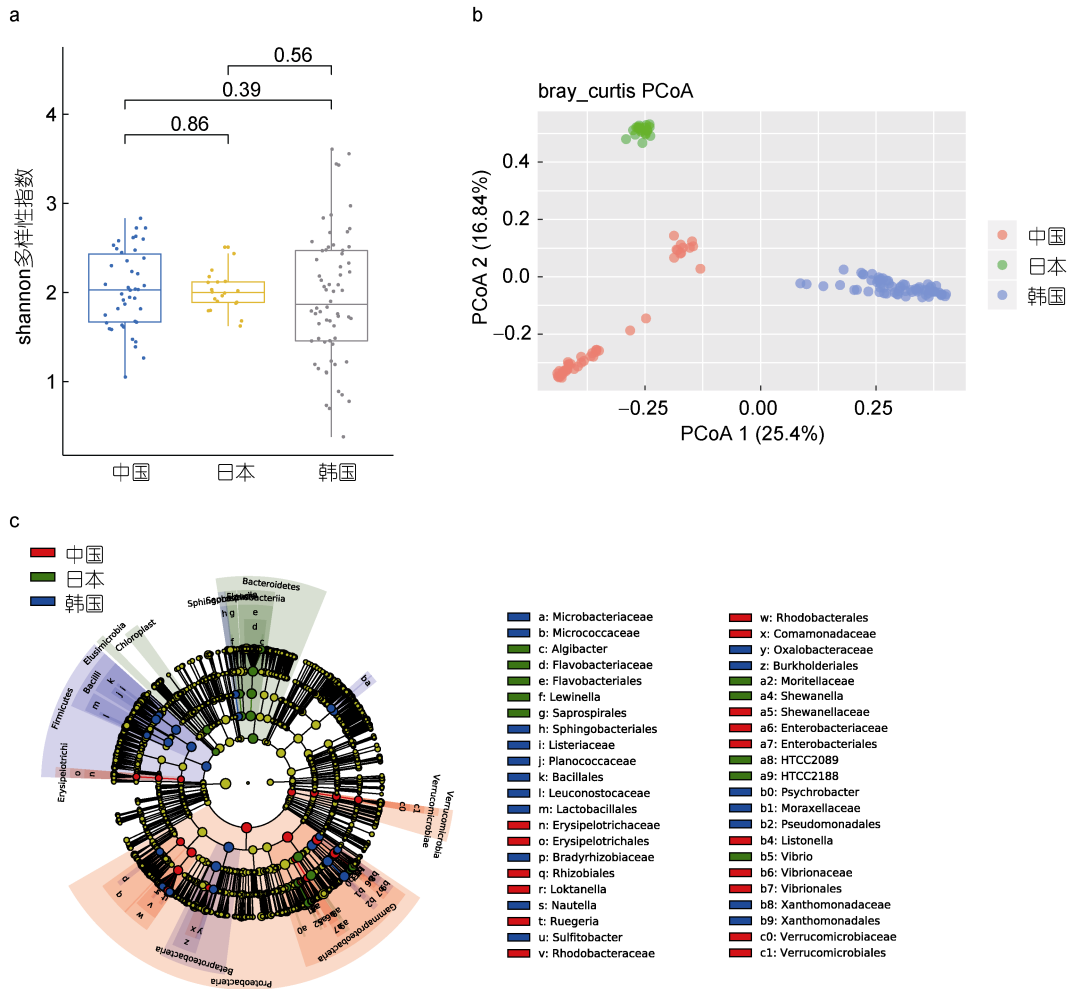


图 3 中国、日本和韩国仿刺参肠道微生物的比较

Fig.3 Comparison in intestinal microorganism among *Apostichopus japonicus* from China, Japan, and Korea
注: a. 中国、日本和韩国仿刺参肠道中微生物的 Alpha 多样性; b. 中国、日本和韩国仿刺参肠道微生物基于 BC 距离的主坐标分析; c. 中国、日本和韩国仿刺参肠道微生物的 LefSe 分析

2.4 中国不同地域仿刺参肠道微生物异同

在本研究中, 中国仿刺参肠道样本来自黄海和渤海两个地域, 包含黄海仿刺参肠道样本 12 个, 渤海仿刺参肠道样本 30 个。黄海仿刺参肠道微生物多样性显著($P=0.00031$)高于渤海(图 4a), 或与海区的开放程度有关。渤海和黄海仿刺参肠道菌群结构同样存在差异, 在主坐标分析(PCoA)中被分为彼此间隔的两组(图 4b)。对两海区样本进行比较, 渤海仿刺参肠道微生物主要富集利斯顿氏菌属、弓形菌属(*Arcobacter*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、*Thalassomonas*、弧菌属、发光菌属(*Photobacterium*)、*Propionigenium*、亮发菌属(*Leucothrix*)和 *Amaricoccus*; 而黄海仿刺参肠道微生物

主要富含 *Lutimonas*、疣微菌属(*Persicirhabdus*)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、*Robiginitalea*、嗜碱海棍状菌属(*Maritimibacter*)、脱硫球菌属(*Desulfococcus*)、*Donghicola*、*Dinoroseobacter*、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、聚球藻属(*Synechococcus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)(图 4c)。

2.5 仿刺参肠道微生物功能及相互作用

根据细菌分类列表对菌群代谢功能进行预测, 在三个国家仿刺参肠道微生物中, 发酵、化能异养和需氧化能异养功能均显著富集, 提示共生菌群在功能上存在共性, 并可能对宿主生理产生相同的作用。日本仿刺参肠道微生物光能自养功能较强, 而韩国

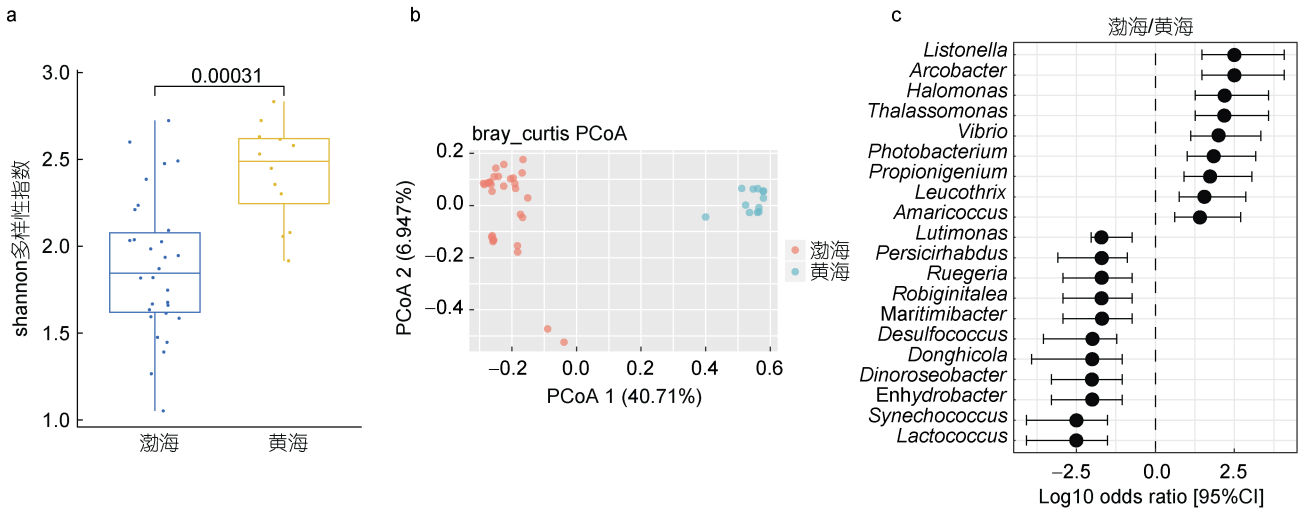


图 4 中国渤海与黄海仿刺参肠道菌群的异同

Fig.4 Similarity and difference in intestinal flora between *A. japonicus* from the Bohai Sea and the Yellow Sea

注: a. 渤海与黄海仿刺参肠道菌群的 Alpha 多样性; b. 渤海与黄海仿刺参肠道菌群基于 BC 距离的主坐标分析; c. 渤海与黄海仿刺参肠道菌群显著差异菌, 正值为渤海相对黄海显著富集, 负值为黄海相对渤海显著富集($P<0.05$)

仿刺参肠道微生物针对硫化物呼吸作用、塑料降解作用和鱼类寄生虫相关的功能明显低于($P<0.05$)中国和日本(图 5a), 体现出不同国家仿刺参养殖群体在共生微生物功能上的区别。运用三个国家仿刺参肠道微生物中差异显著菌属进行相关性网络分析(图 5b), 结果同样发现假单胞菌属、嗜冷杆菌属、利斯顿氏菌属

和弧菌属等细菌在相互作用网络中具有较高的连接度, 显示出这些细菌在仿刺参肠道菌群中可能发挥着非常重要的作用。其中假单胞菌属、乳球菌属与水产常见病原菌弧菌属呈强负相关, 提示可以通过增加两种菌属的数量实现抑制弧菌的效果, 利用生物方法控制水产疾病。

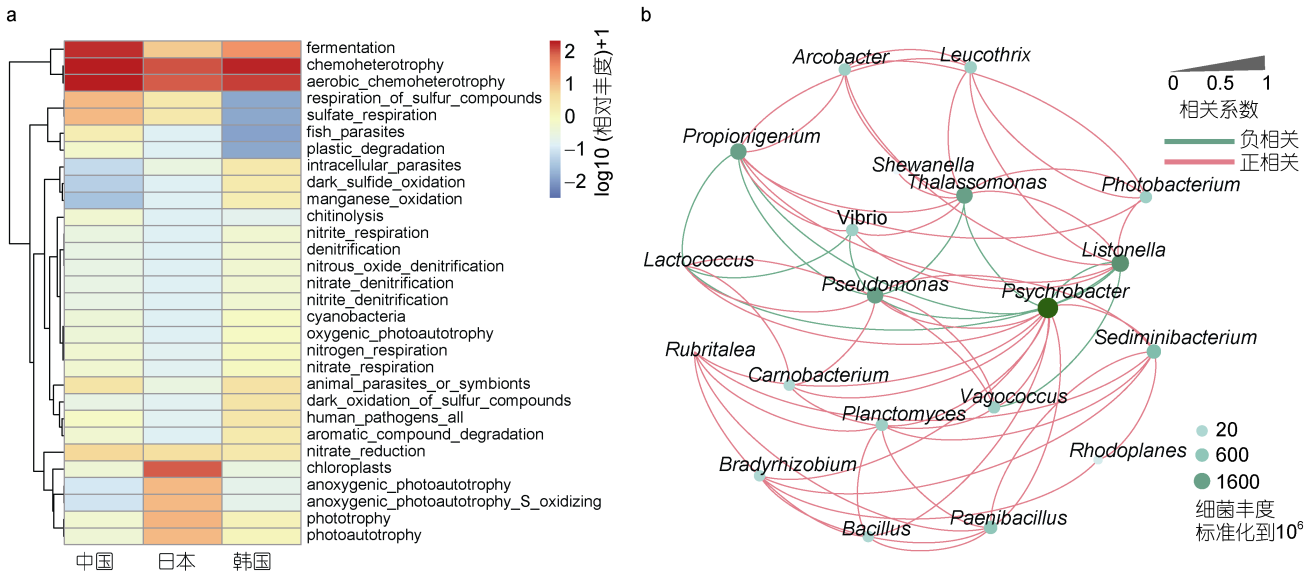


图 5 仿刺参肠道微生物相互关系与功能预测

Fig.5 Correlation and function prediction of intestinal microorganisms in *A. japonicus*

注: a. 三个国家仿刺参肠道微生物代谢功能预测, 将预测后的数据取 log10 后加 1, 再进行聚类; b. 仿刺参肠道微生物的相互作用, 线的粗细表示相关系数的大小, 红色代表正相关, 绿色代表负相关, 点的大小表示菌的相对丰度(标准化至 10 万)

3 讨论

近年来,随着基因组测序技术的不断发展和数据的不断产生,微生物组技术不仅被应用到致病菌的筛查,还可通过组间共生菌群的差异分析,寻找微生物与外界环境的相互作用,以及揭示这些变化对宿主的生理、发育和免疫的影响(Chi *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016), 积累数据为维护机体健康提供支撑。此前有研究表明肠道细菌群落与水生动物的健康直接相关(O'Hara *et al.*, 2006)。另有对水产动物肠道微生物与生存环境的研究发现,肠道与外界环境具有极高的菌群相似性(Zoqratt *et al.*, 2018)。我们的研究表明,仿刺参肠道与外界环境具有极高的共有菌比例,特别是与海水菌群的相似度较高,据此推测动物与水体之间存在着广泛的交流,可能与养殖群体的健康密切相关。

本研究对三个国家的仿刺参进行分析,显示出不同地域之间肠道菌群的差异。需要指出的是,肠道微生物与物种生活环境戚戚相关,不同环境会塑造不同的菌落结构(Kim *et al.*, 2017); 由于日本样品来自于养殖群体,所以不能排除该地域样本肠道菌群特征受到人工养殖因素影响的可能。对中国两个海区的仿刺参进行比较,发现斯顿氏菌、弓形菌属、和弧菌属等在黄海仿刺参肠道菌群中显著高于渤海,异养硝化菌属、疣微菌属和鲁杰氏菌属等在渤海中显著高于黄海,进一步表明存在与海区分布相对应的特征菌群。嗜冷杆菌属在所有仿刺参肠道的富集与海参低温适应的习性可能存在一定的联系; 强化的发酵功能和化能异养功能可能是仿刺参肠道菌群的共性。这些结果为通过微生物组测序和菌群结构来判断海参地域和品系来源创造了可能,由此也提示可以在物种迁移和养殖的过程中,通过检测和分析地域水质和微生物组成,最大程度避免仿刺参对养殖环境产生过度应激反应甚至发生养殖病害(Zhang *et al.*, 2018)。除了了解仿刺参肠道微生物的组成及其与环境的交互外,还应该识别和分离一些益生菌(Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016b; Zhang *et al.*, 2016), 尝试通过补充某些特定的细菌来恢复有缺陷的功能,或者提高宿主免疫力等(Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a; Wang *et al.*, 2017), 这些都是当前海参水产养殖病害防治方面亟待解决的问题(Li *et al.*, 2019)。

在此前对海水的高通量测序中,假单胞菌、乳球菌和弧菌等菌属均被发现广泛存在(肖怀东等, 2009;

Saw *et al.*, 2012)。在本研究中,仿刺参与绿海胆肠道中也发现弧菌在菌群分组中发挥重要作用。值得注意的是,弧菌在水产养殖过程中大多作为病原菌出现(Xue *et al.*, 2017), 在虾类养殖中成为最大的隐患,弧菌引起的细菌性传染病是造成水产养殖经济损失的主要原因(Torres *et al.*, 2018)。本研究中呈现的假单胞菌和乳球菌在仿刺参肠道中富集,且与弧菌存在强负相关性的结果,或揭示了健康仿刺参维持肠道菌群稳定的方式,也可为仿刺参水产养殖和健康管理提供参考,即通过保持高丰度的特殊细菌的数量,压制引起疾病的潜在病原菌的增长,达到控制病害发生的目的。前人的研究中也发现海参肠道中存在大量的杆菌、乳酸菌和假单胞菌(Chi *et al.*, 2014)。在水产养殖中,这些属的大多数成员被当作益生菌,用于对抗病原菌和刺激宿主免疫。本研究发现的显著富集菌属可能对仿刺参的生长具有一定的促进作用,在后续研究中或可作为仿刺参养殖的益生菌加以发展。

4 结论

我们在仿刺参肠道和周围环境中发现了许多常见细菌共存的现象,提示它们之间可能存在密切的交互作用。此外,本研究结果也表明了仿刺参与绿海胆的肠道菌群明显不同,弧菌是区分仿刺参和绿海胆的特征性菌属; 而在仿刺参体内假单胞菌和乳酸菌与常见致病菌弧菌之间存在着强烈的负相关性,提示前两者具有开发成为益生菌的潜力,也可以通过特定细菌丰度的变化来判断仿刺参肠道健康状态,将这些变化作为监测仿刺参感染的指标,为改善养殖环境及促进动物健康生长提供支持。随着越来越多的测序数据公开,整合分析将获得更多的线索和新的信息。虽然还需要进一步的研究来了解和阐明仿刺参共生微生物与宿主之间的关系,但本研究为基于肠道共生菌群确定仿刺参地域分布以及病害防治创造了可能,并为利用微生物组信息制定产品监测策略提供了有价值的参考。

参 考 文 献

- 肖怀东, 陈义光, 刘祝祥等, 2009. 湛江硇洲岛海葵相关可培养细菌系统发育多样性. *微生物学报*, 49(2): 246—250
- Banerjee G, Ray A K, 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci*, 115: 66—77
- Bronstein O, Kroh A, 2018. The first mitochondrial genome of the model echinoid *Lytechinus variegatus* and insights into *Odontophoran* phylogenetics. *Genomics*, doi: 10.1016/j.

- ygeno.2018.04.008
- Chen J H, Ren Y C, Li Y Q *et al*, 2018. Regulation of growth, intestinal microbiota, non-specific immune response and disease resistance of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) in biofloc systems. *Fish Shellfish Immunol*, 77: 175—186
- Chi C, Liu J Y, Fei S Z *et al*, 2014. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 38(2): 367—373
- Conand C, 2018. Tropical sea cucumber fisheries: changes during the last decade. *Mar Pollut Bull*, 133: 590—594
- Coyte K Z, Schluter J, Foster K R, 2015. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*, 350(6261): 663—666
- Duan Y F, Zhang Y, Dong H B *et al*, 2017. Effect of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on growth, intestine antioxidant capacity and resistance to high temperature stress in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *J Therm Biol*, 66: 93—100
- Endesfelder D, zu Castell W, Ardisson A *et al*, 2014. Compromised gut microbiota networks in children with anti-islet cell autoimmunity. *Diabetes*, 63(6): 2006—2014
- Fava F, Rizzetto L, Tuohy K M, 2019. Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proc Nutr Soc*, 78(2): 177—188
- Gao Y, Wang J F, Zheng Y *et al*, 2016. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat Commun*, 7: 12060
- Giardine B, Riemer C, Hardison R C *et al*, 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*, 15(10): 1451—1455
- Gupta S, Fečkaninová A, Lokesh J *et al*, 2019. Lactobacillus dominate in the intestine of Atlantic salmon fed dietary probiotics. *Front Microbiol*, 9: 3247
- Hai N V, 2015. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol*, 119(4): 917—935
- Hong H H, Choi H, Cheon S *et al*, 2017. Genome sequences of two *Shewanella* spp. isolated from the gut of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867). *Genome Announc*, 5(29): e00674-17
- Huang S, Li R, Zeng X W *et al*, 2014. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *ISME J*, 8(9): 1768—1780
- Jo J, Choi H, Lee S G *et al*, 2017. Draft genome sequences of *Pseudoalteromonas tetraodonis* CSB01KR and *Pseudoalteromonas lipolytica* CSB02KR, isolated from the gut of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Genome Announc*, 5(28): e00627-17
- Kim T Y, Lee J J, Kim B S *et al*, 2017. Whole-body microbiota of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) from South Korea for improved seafood management. *J Microbiol Biotechnol*, 27(10): 1753—1762
- Lazado C C, Caipang C M A, 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol*, 39(1): 78—89
- Li L, Chen M Y, Storey K B, 2019. Metabolic response of longitudinal muscles to acute hypoxia in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka): a metabolome integrated analysis. *Comp Biochem Physiol Part D: Genom Proteomics*, 29: 235—244
- Li X Y, Jing K L, Wang X T *et al*, 2016a. Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental *Vibrio splendidus* infection in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol*, 48: 105—111
- Li Z, Li X Y, Zhang J C *et al*, 2016b. Use of phages to control *Vibrio splendidus* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 54: 302—311
- Li C, Ren Y C, Jiang S H *et al*, 2018. Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Fish Shellfish Immunol*, 74: 69—75
- Louca S, Parfrey L W, Doebeli M, 2016. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305): 1272—1277
- Magoč T, Salzberg S L, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957—2963
- Mashjoor S, Yousefzadi M, 2017. Holothurians antifungal and antibacterial activity to human pathogens in the Persian Gulf. *J Mycol Méd*, 27(1): 46—56
- O'Hara A M, Shanahan F, 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7(7): 688—693
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al*, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(D1): D590—D596
- Quiroz-Guzmán E, Vazquez-Juárez R, Luna-González A *et al*, 2018. Administration of probiotics improves the brine shrimp production and prevents detrimental effects of pathogenic *Vibrio* species. *Mar Biotechnol (NY)*, 20(4): 512—519
- Ratana-Arporn P, Jommark N, 2014. Efficacy of neutral electrolyzed water for reducing pathogenic bacteria contaminating shrimp. *J Food Prot*, 77(12): 2176—2180
- Roux S, Brum J R, Dutilh B E *et al*, 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature*, 537(7622): 689—693
- Saw J H W, Yuryev A, Kanbe M *et al*, 2012. Complete genome sequencing and analysis of *Saprospira grandis* str. Lewin, a predatory marine bacterium. *Stand Genomic Sci*, 6(1): 84—93
- Torres M, Reina J C, Fuentes-Monteverde J C *et al*, 2018. AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS One*, 13(4): e0195176
- Tunca E, Aydın M, Şahin Ü, 2016. Interactions and accumulation differences of metal(loid)s in three sea cucumber species

- collected from the Northern Mediterranean Sea. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(20): 21020—21031
- Wang J F, Gao Y, Zhao F Q, 2016. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ Microbiol*, 18(7): 2143—2158
- Wang H D, Liu S K, Cui J *et al*, 2015. Identification and characterization of microRNAs from longitudinal muscle and respiratory tree in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) using high-throughput sequencing. *PLoS One*, 10(8): e0134899
- Wang X T, Sun Y X, Wang L L *et al*, 2017. Synbiotic dietary supplement affects growth, immune responses and intestinal microbiota of *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 68: 232—242
- Wang H, Xue Z, Liu Z Q *et al*, 2018. A novel C-type lectin from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (AjCTL-2) with preferential binding of D-galactose. *Fish Shellfish Immunol*, 79: 218—227
- Xiong J B, Wang K, Wu J F *et al*, 2015. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(16): 6911—6919
- Xue S X, Xu W, Wei J L *et al*, 2017. Impact of environmental bacterial communities on fish health in marine recirculating aquaculture systems. *Vet Microbiol*, 203: 34—39
- Yamazaki Y, Meirelles P M, Mino S *et al*, 2016. Individual *Apostichopus japonicus* fecal microbiome reveals a link with polyhydroxybutyrate producers in host growth gaps. *Sci Rep*, 6: 21631
- Yang G, Peng M, Tian X L *et al*, 2017. Molecular ecological network analysis reveals the effects of probiotics and florfenicol on intestinal microbiota homeostasis: an example of sea cucumber. *Sci Rep*, 7(1): 4778
- Zakrzewski M, Proietti C, Ellis J J *et al*, 2017. Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5): 782—783
- Zhang W W, Liang W K, Li C H, 2016. Inhibition of marine *Vibrio* sp. by pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *J Hazard Mater*, 302: 217—224
- Zhang Z, Xing R L, Lv Z M *et al*, 2018. Analysis of gut microbiota revealed *Lactococcus garviaeae* could be an indicative of skin ulceration syndrome in farmed sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 80: 148—154
- Zhu J Y, Dai W F, Qiu Q F *et al*, 2016. Contrasting ecological processes and functional compositions between intestinal bacterial community in healthy and diseased shrimp. *Microb Ecol*, 72(4): 975—985
- Zhu Z J, Zhu B W, Sun Y J *et al*, 2018. Sulfated polysaccharide from sea cucumber modulates the gut microbiota and its metabolites in normal mice. *Int J Biol Macromol*, 120: 502—512
- Zoqratt M Z H M, Eng W W H, Thai B T *et al*, 2018. Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. *PeerJ*, 6: e5826

INTESTINAL MICROBIOTA IN *APOSTICHOPUS JAPONICUS*: REGIONAL DIFFERENCE AND COMMON FEATURE

CHAI Ying-Hui¹, GAO Fei², WANG Jin-Feng³, ZHOU Wen-Li¹

(1. College of Fisheries and Agriculture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. College of Oceanology, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Beijing Institute of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Diseases and pathogens in *Apostichopus japonicus* are high concerns in the mariculture for this high economic value species. However, knowledge on the compositions and regional difference in its symbiotic microbiota, and the communication with water environment, remains very limited. In this study, we retrieved 786 high-throughput sequencing data of 16S rRNA amplicons of *A. japonicus* intestine, seawater, and sediment samples collected from China, Japan, and Korea, and compared them in bacterial community composition, to explore relationship between intestinal microbes and region or environment. The results show that although the proportion of bacterial component in the gut, water, and sediment were different, they shared a large number of bacterial genera, indicating that *A. japonicus* may take considerable microorganisms from the ambience. Compared with those of seawater and sediment samples, the microbial diversity in *A. japonicus* intestine was the lowest with the fewest genus, suggesting that the microbes were selected in the intestinal microenvironment, of which genera Proteobacteria, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, and *Listonella* were particularly obvious enriched. Although the Alpha diversities of intestinal microbiota of *A. japonicus* from China, Japan, and Korea were not significantly different, samples are placed in different clusters in the principal coordinate analysis according to the geographical sources, of which each cluster had its specific bacterial taxa. Similar results were found when comparing the intestinal microbiota of *A. japonicus* from the Bohai Sea and the Yellow Sea of China, showing a universally regional difference. Functional prediction showed that *A. japonicus* intestinal microbiota from all the three countries had fermentation, heterotrophic and oxidative heterotrophic functions, indicating that the symbiotic bacteria have some core functions and may produce the same effects on host physiology. This study reveals that there are significant differences in intestinal microbiota of *A. japonicus* in different regions, and such microbiota has a close relationship with the water environment. These findings provide information for the study on the symbiotic microbes and their correlation with host health, which may play a role in understanding the natural circulation process and the protection of fishery resources.

Key words *Apostichopus japonicus*; intestinal tract; sea water; sediment; microbiome; geography