

文章编号: 1674-5566(2025)06-1226-14

DOI: 10.12024/jsou.20241004661

基于16S rRNA高通量测序的腹吸鳅科鱼类消化道微生物群落

杨 柳¹, 陈敬琛¹, 唐文乔^{1,2}

(1. 上海海洋大学 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 腹吸鳅科(Gastromyzontidae)鱼类主要栖息于亚洲东南部山区溪流, 该科鱼类体型扁平, 偶鳍宽大, 部分种类偶鳍特化为吸盘状。为了解腹吸鳅科鱼类肠道微生物群落的多样性和结构, 本文对保亭近腹吸鳅(*Plesiomyzon baotingensis*)、秉氏爬岩鳅(*Beaufortia pingi*)、贵州爬岩鳅(*Beaufortia kweichowensis*)、拟平鳅(*Liniparhomaloptera disparis*)、中华近原吸鳅(*Erromyzon sinensis*)、似原吸鳅(*Paraprotomyzon multifasciatus*)、方氏品唇鳅(*Labidogastromyzon fangi*)、长汀品唇鳅(*Labidogastromyzon changtingensis*)、平舟原缨口鳅(*Vanmanenia pingchowensis*)、原缨口鳅(*Vanmanenia stenosoma*)、扁头原缨口鳅(*Vanmanenia homalocephala*)、斑纹缨口鳅(*Formosania stigmata*)等8个属12个物种的肠道样本进行了MiSeq 16S rRNA高通量测序, 分析了操作分类单元(OTU)数量、微生物群落组成、Alpha多样性以及功能预测。共鉴定出1 029个OTU, 涵盖31门75纲173目278科465属689种, 每种平均OTU数175个, 共有OTU数3个。在群落组成上, 优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、放线菌门(Actinobacteriota)和疣微菌门(Verrucomicrobiota), 优势菌属为无色杆菌属(*Achromobacter*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等。共有菌属为红球菌属(*Rhodococcus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和赖氏菌属(*Leifsonia*)。Alpha多样性分析表明, 不同物种的微生物群落在物种丰富度和多样性方面存在显著差异。秉氏爬岩鳅的多样性最高, 而原缨口鳅的多样性最低。利用KEGG通路分析发现, 肠道微生物编码的大多数基因与代谢过程相关, 其中与氨基酸转运和代谢相关的功能通路相对丰度最高, 为11.40%。从OTU数和OTU水平的PCoA分析角度看, 很难预测其与系统发育之间的关联性。相比生活在平原和河湖系统的鱼类, 腹吸鳅科鱼类的优势群属中包含诸如分枝杆菌属(*Mycobacterium*)的专性需氧菌(占9.47%), 以及一些偏好有氧环境的兼性厌氧菌, 如无色杆菌属(*Achromobacter*)(占比24.91%)等。

关键词: 16S rRNA; 肠道微生物; 优势菌群; 物种多样性

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

消化道是鱼体进行食物消化、吸收和废物排泄的场所, 在免疫保护、内分泌和水电矿物内稳态等方面也有重要作用, 承担着体内和体外环境之间物质和能量交换的重要任务^[1-2]。鱼类的消化道中包含了许多来自环境或者饵料的菌群, 其与宿主以及所处的水环境形成相互依赖、相互制约的微生态体系, 与鱼类的生长发育、营养吸收与代谢、免疫等诸多生理生化功能息息相关^[3]。分析鱼类消化道微生物的群落结构, 有助于了解

鱼类的生理特点及其生长的环境特征, 对深入理解鱼类的生理生态具有重要意义^[4]。目前已对鲤、鲫、草鱼、鳊等养殖鱼类和多种野生鱼类的肠道菌群做过研究^[5-6]。有研究^[7]认为, 鱼类的肠道微生物菌群主要受宿主遗传因素的影响, 因此同一类群内存在共有菌群; 也有研究^[8-9]认为, 鱼的种类、食性、饵料以及环境因子等诸多因素, 均会对鱼类肠道微生物群落产生影响。

腹吸鳅科(Gastromyzontidae)隶属于鲤形目

收稿日期: 2024-10-14 修回日期: 2025-02-27

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900802); 国家自然科学基金(31093430)

作者简介: 杨 柳(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物学。E-mail: 1654430887@qq.com

通信作者: 唐文乔, E-mail: wqtang@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

(Cypriniformes),为一类身体平扁、腹面平坦、胸鳍与腹鳍宽大平展、口周围具有多对须的小型底栖鱼类,成体体长通常不足 10 cm^[10]。目前已发现 19 属 147 种,集中分布在中国南部、东南亚和南亚。中国有 11 属 60 种,均分布于秦岭以南^[11]。腹吸鳅科鱼类高度适应激流生活,身体结构特化,扩散能力较弱,是研究动物地理学和生态适应性的理想材料^[10,12]。目前对腹吸鳅科的研究多集中于形态分类与分子系统发育等方面^[10,12-15],亦有少量基础生物学研究^[16],对生理生态等研究还很少,也未见有关肠道菌群的研究报道。该科鱼类的生活环境较少受水产养殖等影响。高通量测序是当前动物肠道微生物群落研究的主流方法^[17],其最大优势在于能精确解析肠道微生物菌群的种类和数量,阐述微生物群落的结构特点和优势菌群。本文选取分布于我国的 8 属 12 种腹吸鳅科鱼类,采用高通量测序技术对肠道微生物组成作了分析,旨在阐述这群栖息于特殊生境中鱼类的肠道微生物结构特点。

1 材料与方法

1.1 实验样本采集与处理

所有样本均用手抄网在野外实地采样,采集的时间与地点信息列于表 1。将采集到的活鱼样本饲养在装有采集地适量清水的塑料袋中,充氧后快递到实验室,立即放置在长宽高 60 cm×50 cm×40 cm 的玻璃水箱中。分别在室内的自然光下,使用 48 h 以上曝气的自来水进行暂养,水温控制在 24 ℃左右,不投饵,每日进行一次吸污和换水处理,换水量约为总水量的 1/3。饥饿饲养 7 d,排除消化道内的食物残渣。每个物种随机选择 5 尾游泳姿势正常、外表无损伤的个体,用作肠道微生物分析的群体样本。用无菌水清洗鱼体表面,无菌环境中解剖并取出肠道,装至无菌 5 mL 离心管中。为保证肠道微生物的总 DNA 提取量达到测序标准并消除个体差异,将每个物种的 5 尾样本合在一起作为 1 个分析样本,于 -80 ℃超低温冰箱中暂存。

表 1 实验物种的样本采集信息
Tab. 1 Sample collection information for experimental species

物种名称 Species	物种缩写 Abbreviation	采集时间 Time	采集地点 Location	经纬度 Longitude and latitude	水系 River
保亭近腹吸鳅 <i>Plesiomyzon baotingensis</i>	PBA	2023 年 5 月	海南海口市美兰区	110.431 7°E, 19.930 9°N	南渡江
贵州爬岩鳅 <i>Beaufortia kweichowensis</i>	BKW	2023 年 3 月	贵州黔东南苗族侗族自治州从江县	108.676 7°E, 25.756 5°N	西江
秉氏爬岩鳅 <i>Beaufortia pingi</i>	BPI	2023 年 3 月	广西百色市凌云县	106.556 6°E, 24.375 4°N	西江
拟平鳅 <i>Liniparhomaloptera disparis</i>	LDI	2023 年 4 月	广西防城港市东兴市	107.956 0°E, 21.561 2°N	北仑河
中华近原吸鳅 <i>Erromyzon sinensis</i>	ESI	2023 年 3 月	广西来宾市金秀瑶族自治县	110.108 5°E, 24.260 4°N	西江
似原吸鳅 <i>Paraprotomyzon multifasciatus</i>	PMU	2023 年 3 月	广西百色市田林县	106.059 4°E, 24.252 6°N	西江
长汀品唇鳅 <i>Labigastromyzon changtingensis</i>	PCT	2023 年 4 月	江西上饶市铅山县	117.738 1°E, 28.316 9°N	信江
方氏品唇鳅 <i>Labidogastromyzon fangi</i>	PFA	2023 年 4 月	广西桂林市临桂区	110.190 1°E, 25.247 2°N	西江
平舟原缨口鳅 <i>Vanmanenia pingchowensis</i>	VPI	2023 年 5 月	湖南株洲市炎陵县	113.705 4°E, 26.471 0°N	湘江
原缨口鳅 <i>Vanmanenia stenosoma</i>	VST	2023 年 4 月	浙江绍兴市上虞区	120.825 5°E, 30.059 9°N	钱塘江
扁头原缨口鳅 <i>Vanmanenia homalocephala</i>	VHO	2023 年 4 月	广西桂林市临桂区	110.190 1°E, 25.247 2°N	西江
斑纹缨口鳅 <i>Formosania stigmata</i>	CST	2023 年 3 月	福建南平市武夷山市	118.000 9°E, 27.685 5°N	闽江

1.2 微生物DNA的提取

按照磁珠法(QJ磁珠DNA提取试剂盒)提取肠道菌群的DNA,提取过后进行1%琼脂糖凝胶电泳,并用Nanodrop 2000检测DNA产物的浓度和质量,-20℃冰箱冷冻备用。

1.3 16S rRNA的扩增和测序

将12个物种的肠道微生物DNA样本用于冰冷冻,送至上海美吉生物公司进行后续高通量测序和生物信息分析。PCR扩增采用的引物为338F(5'-ACTCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')16SrRNA,PCR扩增和纯化使用TransStart Fastpfu DNA Polymerase试剂盒进行。PCR正式实验的实验步骤为:10 μL 2×Pro Taq,再分别加入0.8 μL的5 mmol/L引物806R和引物338F,DNA模板浓度为10 ng,最后加入ddH₂O补足反应物容量直至20 μL。

PCR反应过程:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸45 s,接着重复以上变性、退火、延伸步骤29次,最后72℃延伸10 min。使用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,切割回收。结果表明:产物目的条带大小正确,浓度合适,可进行后续实验。使用Axy Prep DNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物,将PCR产物用Quanti Fluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,之后根据每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。使用Illumina测序专用的TruSeq™ DNA Sample Prep Kit试剂盒建立基因文库,构建好的文库通过Illumina Miseq PE300平台进行高通量测序。

1.4 数据分析处理

1.4.1 操作分类单元(OTU)聚类

Miseq测序得到双端序列数据(reads),根据PE reads之间的overlap关系,使用Trimmomatic、FLASH软件将成对的reads经过质控、拼接、过滤、去重、矫正序列方向等过程优化数据,再采用Uparse(version 7.0.1090<http://drive5.com/uparse/>)软件对所得序列进行处理,并根据97%相似度水平对序列进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类,利用Silva(Release138<http://www.arb-silva.de>)数据库在不同分类水平上进行比对和注释,从而获得每个OTU所对应的

物种分类信息。

1.4.2 Alpha多样性

Alpha多样性分析可以获得肠道微生物群落中物种的丰富度、多样性和菌群覆盖度等信息。使用实际测量出的OTU数(S_{obs})、ACE指数(S_{ace})和Chao1指数(S_{chao1})可反映肠道微生物菌群丰度;覆盖率指数(Coverage, C)可反映菌群覆盖度;Simpson优势度指数(D)和Shannon-Wiener多样性指数(H')可反映菌群多样性状况。具体的计算公式如下:

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (1)$$

$$S_{ace} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ace}} + \frac{n_1}{C_{ace}} \gamma_{ace}^2 \quad (2)$$

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{abund}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \quad (3)$$

$$H'_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{abund}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (4)$$

$$C = 1 - \frac{n_1}{N} \quad (5)$$

式中: n_1 为只含有1条序列的OTU数(如singleton); n_2 为只含有2条序列的OTU数; n_i 为含有*i*条序列的OTU数; N 为样本中出现的总序列数; S_{abund} 为含有超过10条序列的OTU数; S_{rare} 为含有不多于10条序列的OTU数; C_{ace} 为所有低丰度(出现≤10次)的物种中非Singleton的比例; γ_{ace}^2 为变异系数。

1.4.3 统计分析

利用R语言(version 3.3.1)软件制作并分析稀释性曲线图、韦恩(Venn)图、成分分析图、群落物种组成及物种丰度等信息。使用PICRUST2菌群代谢功能预测工具对OTU丰度表进行标准化,然后通过每个OTU对应的Green Gene ID,对OTU进行COG和KEGG功能注释,从而获得OTU在COG、KEGG各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。

2 结果与分析

2.1 稀释曲线分析

由图1可知,当测序数在5 000以上时,各样本实际观测到的OTU数(S_{obs})随着所测序列数的增加而快速增大,也就是在腹吸鳅科鱼类肠道中还能有大量的菌群被发现;但当测序深度大于

50 000 时,除了拟平鳅(LDI)和斑纹缨口鳅(CST)样本略呈增长趋势外,其他样本的 S_{obs} 曲线呈平坦趋势,这表明测序的数据量和测序的深度

足够反映样本中肠道菌群的组成和多样性情况。

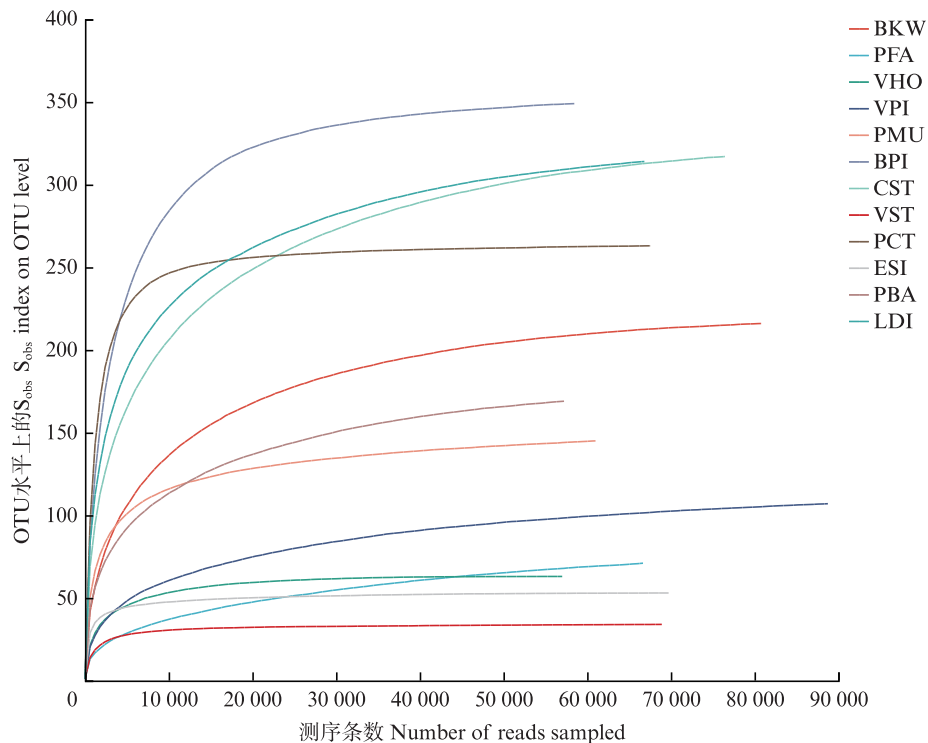


图1 测序样本的肠道菌群稀释性曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of gut microbiota from sequenced samples

2.2 肠道微生物的OTU数量

将测序数据进行质控处理后,12个物种共得到853 313条有效序列,平均拥有71 463条。99.9%序列长度区间为400~500 bp,平均为417.20 bp。对所有序列进行97%相似水平聚类后得到1 029个不同的OTU,每种平均175个。其中,包含OTU数较多的为秉氏爬岩鳅(BPI)、斑纹缨口鳅(CST)和拟平鳅(LDI),分别有349个、317个和314个;其次是长汀品唇鳅(PCT)、贵州爬岩鳅(BKW)、保亭近腹吸鳅(PBA)、似原吸鳅(PMU)和平舟原缨口鳅(VPI),分别有263个、216个、169个、145个和107个;最少的是方氏品唇鳅(PFA)、扁头原缨口鳅(VHO)、中华近原吸鳅(ESI)和原缨口鳅(VST),分别仅有71个、63个、53个和34个。

从OTU分布花瓣图(图2)中可以发现,12个物种共有的OTU数为3个。各个物种特有的OTU平均数为54个。其中,特有OTU数较多的是长汀品唇鳅(PCT)、秉氏爬岩鳅(BPI)和斑纹

缨口鳅(CST),分别为196个、132个和110个;较少的是方氏品唇鳅(PFA)和似原吸鳅(PMU),仅有4个和8个;其他7种为10~76个。

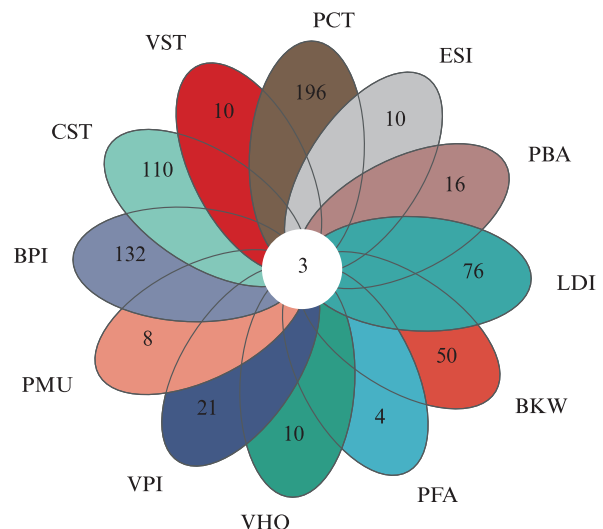


图2 腹吸鳅科鱼类肠道微生物群落OTU分布花瓣图
Fig. 2 OTU distribution venn diagram of gut microbiota in Gastromyzontidae fish

2.3 Alpha 多样性分析

对 12 种腹吸鳅科鱼类样本的测序结果进行 Alpha 多样性指数分析,结果列于图 3。Alpha 多样性能反映单个样本物种丰度及物种多样性,其中 Chao1 和 Ace 指数用于衡量物种丰度,Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性,Shannon 指数越大,Simpson 指数越小,则说明样品的物种多样性越高。由图 3 可知,秉氏爬岩鳅(BPI)的 S_{obs} 、Ace、Chao1 值最大,分别为 349、352.63、

358.1, Simpson 值较小,仅为 0.14,表明该物种肠道菌群中微生物种类丰富,多样性最高。原缨口鳅(VST)的 S_{obs} 、Ace、Chao1 值最小,分别为 34、34.52、34,表明该物种肠道菌群中微生物种类较少,多样性最低。拟平鳅(LDI)的 Shannon 值最小,为 1.52, Simpson 值最大,为 0.51,表明该物种肠道菌群中微生物种类的多样性和均匀度最低。

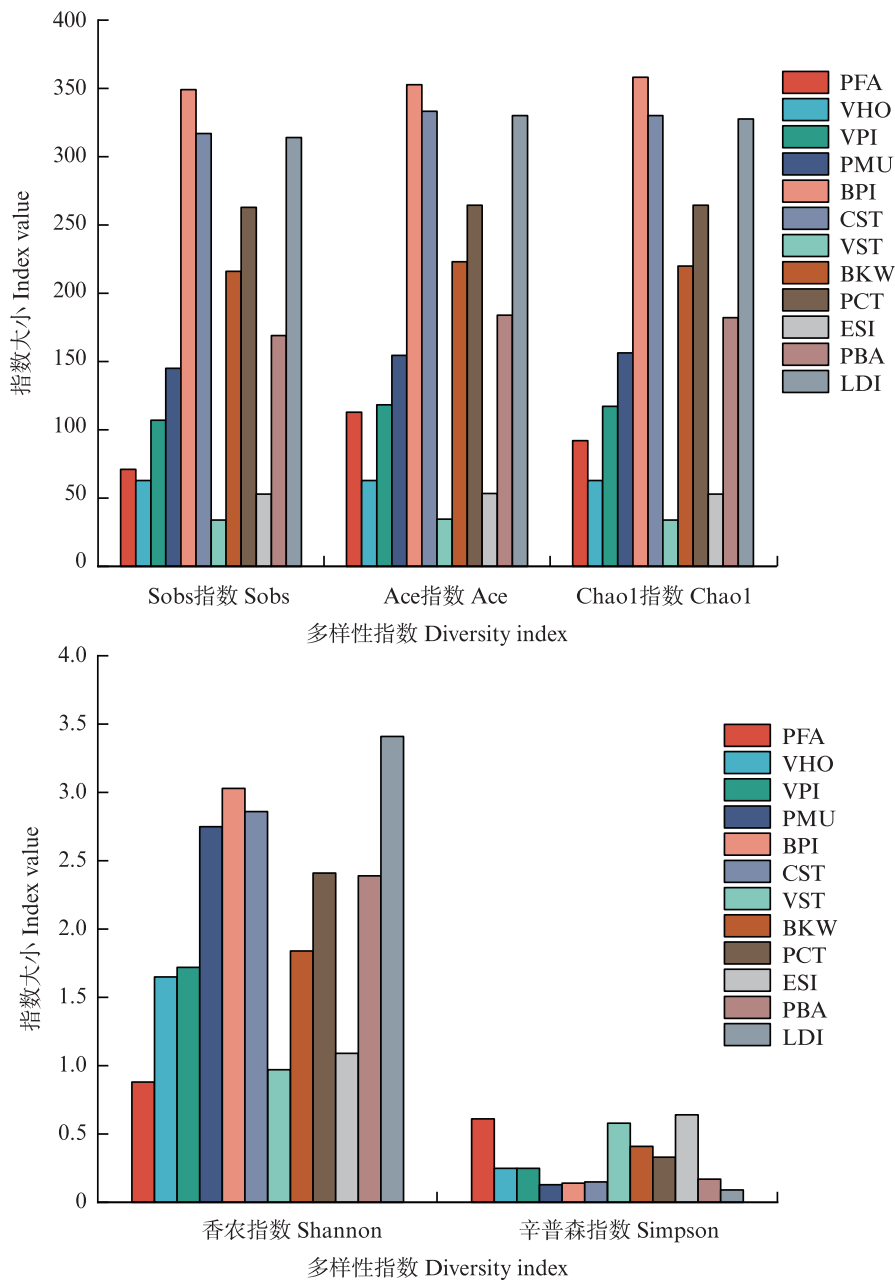


图3 腹吸鳅科鱼类肠道菌群 Alpha 多样性指数

Fig. 3 Alpha diversity indices of gut microbiota in Gastromyzontidae fish

2.4 肠道微生物群落组成

将 1 029 个 OTU 与 Silva 数据库进行比对,共检测出 31 门 75 纲 173 目 278 科 465 属 689 种肠道微生物。每个物种平均包含 13 门,其中长汀品唇鳅(PCT)包含 26 门,扁头原缨口鳅(VHO)和原缨口鳅(VST)均仅有 7 门。12 个物种合计,肠道微生物丰度占 1% 以上的优势菌群有变形菌门(Proteobacteria, 58.43%)、放线菌门(Actinobacteriota, 18.04%)、梭杆菌门(Fusobacteriota, 13.33%)、疣微菌门(Verrucomicrobiota, 4.08%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 2.74%)、厚壁菌门(Firmicutes, 1.10%)等。但不同物种间优势菌门所占比例存在较大的差异,如变形菌门在原缨口鳅(VHO, 90.97%)、中华近原吸鳅(ESI, 88.20%)、秉氏爬岩鳅(BPI, 83.86%)、原缨口鳅(VST, 79.89%)、似原吸鳅(PMU, 77.24%)、长汀品唇鳅(PCT, 65.89%)、平舟原缨口鳅(VPI, 62.93%)、保亭近腹吸鳅(PBA, 59.85%)和斑纹缨口鳅(CST, 43.24%)中均为第一优势菌群;但在贵州爬岩鳅(BKW)和拟平鳅(LDI)为第二优势菌群,第一优势菌门为放线菌门,占比分别为 68.41% 和

53.57%。方氏品唇鳅(PFA)中占比最高的是梭杆菌门,比例为 76.54%(图 4)。

12 个物种共鉴定出 75 纲,每种平均包含 20 纲;其中以长汀品唇鳅(PCT)所含最多,为 59 纲;扁头原缨口鳅(VHO)和原缨口鳅(VST)最少,均为 9 纲。占优势的是 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 37.94%)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 20.50%)、放线菌纲(Actinobacteria, 17.85%)和梭杆菌纲(Fusobacteriia, 13.33%),但不同物种在纲的组成比例上存在明显的差异(图 5)。

12 个物种共鉴定出 278 科,每种平均包含 73 科,其中最多的长汀品唇鳅(PCT)有 146 科,最少的原缨口鳅(VST)仅 25 科。主要以产碱菌科(Alcaligenaceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)、分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)等为主,但不同物种在科的组成比例上也存在明显的差异(图 6)。如中华近原吸鳅(ESI)、原缨口鳅(VST)和长汀品唇鳅(PCT)均以产碱菌科为第一优势菌群,占比分别达 79.61%、75.41%和 56.06%;方氏品唇鳅(PFA)占比最高的梭杆菌科为 76.54%;贵州爬岩鳅(BKW)占比最高的分枝杆菌科为 63.10%。

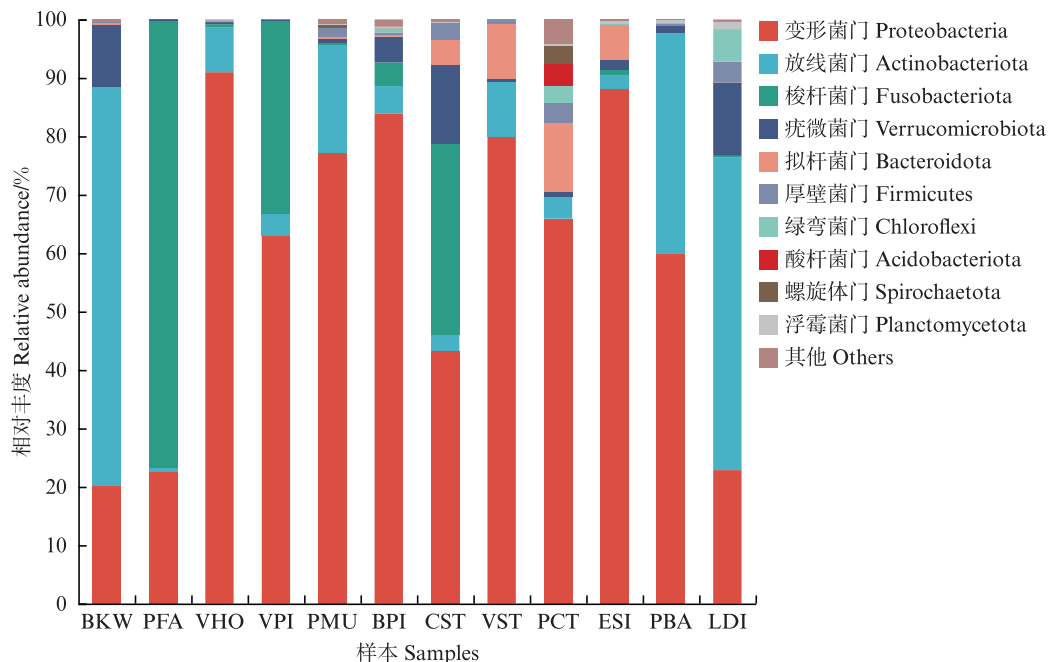


图 4 每个样本门分类水平的组成
Fig. 4 Taxonomic composition at the phylum level for each sample

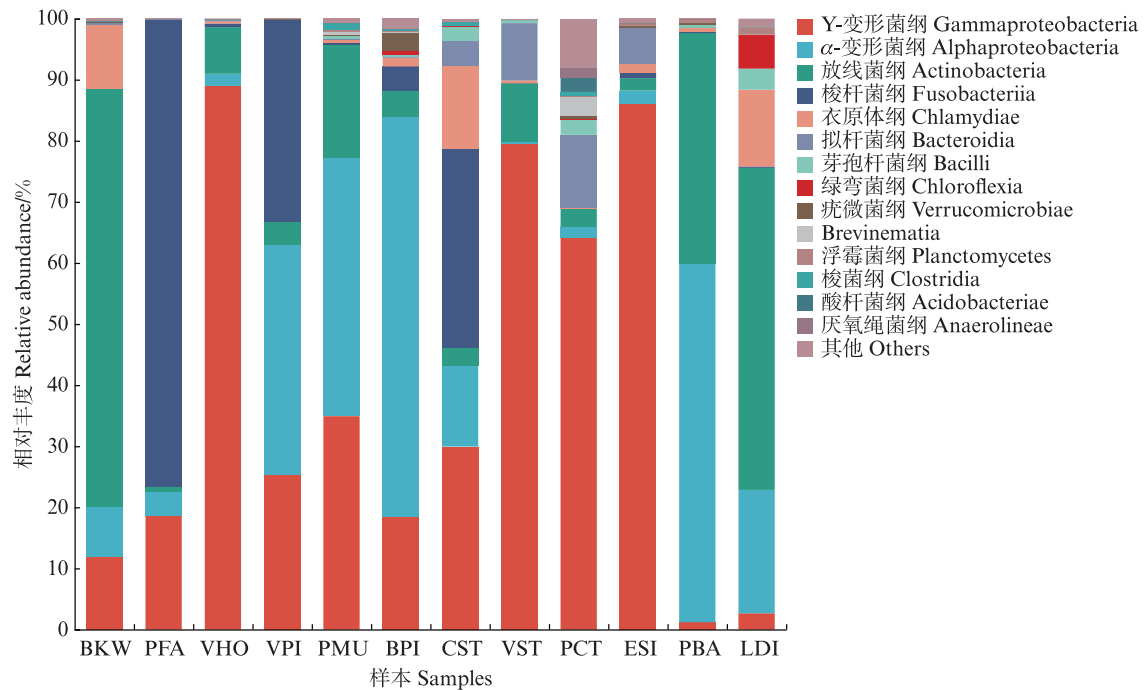


图5 每个样本纲分类水平的组成

Fig. 5 Taxonomic composition at the class level for each sample

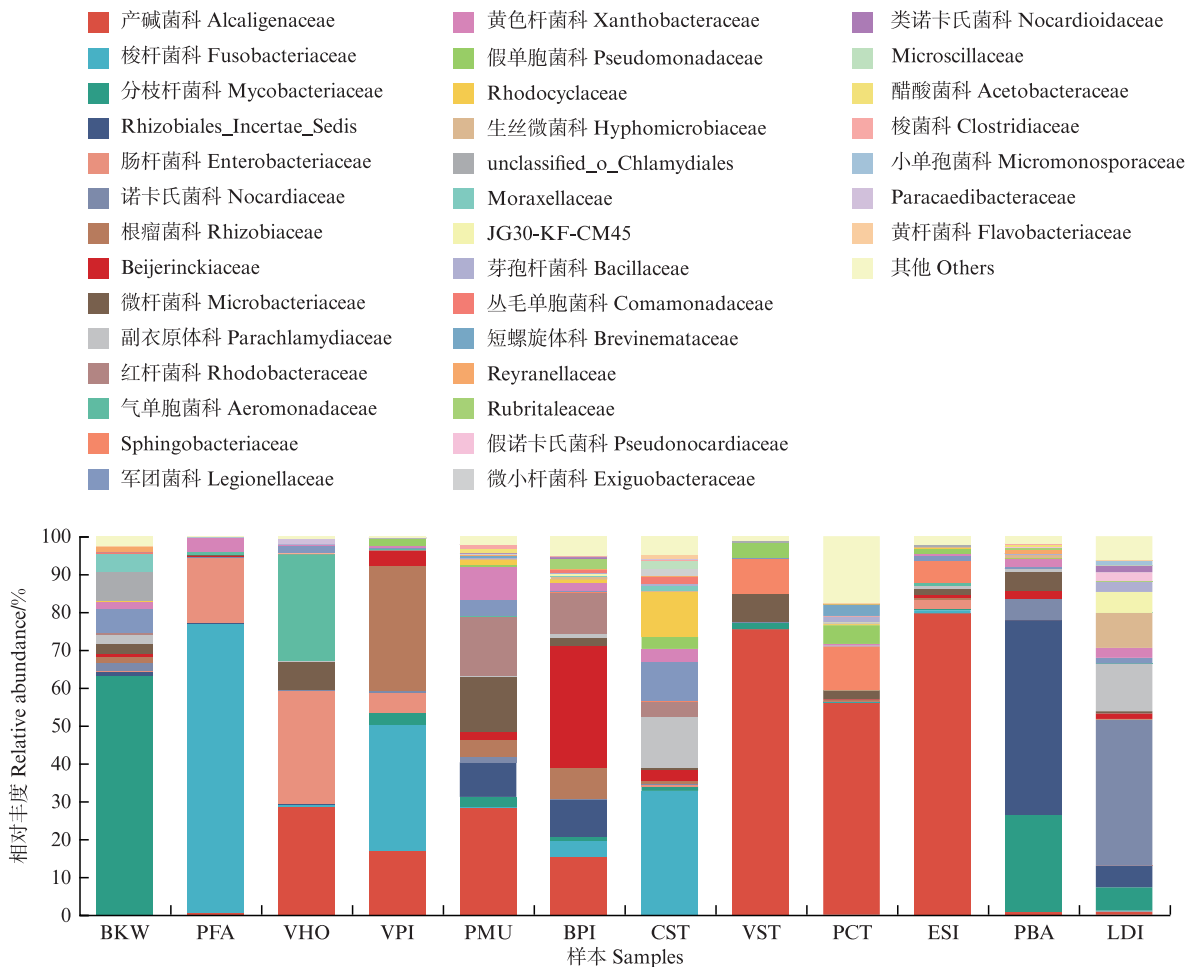


图6 每个样本科分类水平的组成

Fig. 6 Taxonomic composition at the family level for each sample

在属分类水平上(图 7),12 种腹吸鳅科平均包含 107 属肠道微生物,其中最多的斑纹缨口鳅(CST)含有 253 个属,最少的原缨口鳅(VST)仅包含 31 个属。其中,分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和赖氏菌属(*Leifsonia*)为 12 个物种的共有菌属,占比分别为 6.35%、2.67% 和 1.98%。12 种腹吸鳅科合计的主要优势菌群有无色杆菌属(*Achromobacter*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、*Bosea* 等,占比分别为 24.91%、13.33%、9.47%、3.74%、3.59%、3.33%。但不同物种的第一优势菌属不尽相同,无色杆菌属为中华近原吸鳅(ESI)、原缨口鳅(VST)、长汀品唇鳅(PCT)、扁头原缨口鳅(VHO)和似原吸鳅(PMU)的第一优势菌属,其占比分别为 79.61%、75.41%、56.06%、28.53% 和 28.34%;鲸杆菌属为方氏品唇鳅(PFA)和平舟原缨口鳅(VPI)的第一

优势菌属,占比为 76.54% 和 33.2%;分枝杆菌属为贵州爬岩鳅(BKW)的第一优势菌属,占比为 63.10%。

2.5 OTU 水平的 PCoA 分析

在 OTU 分类水平上,运用 bray-curtis 距离算法对腹吸鳅科 12 个物种的肠道微生物群落样本进行 PCoA 分析,结果显示主坐标轴 PC1、PC2 的解释度分别为 29.42% 和 20.10%(图 8)。以 PC1 为横轴,PC2 为纵轴建立散点图,位于同一个象限内的物种,其肠道微生物群落结构差异较小;不同象限之间的物种,其肠道微生物群落结构差异较大。其中,似原吸鳅(PMU)位于第一象限;拟平鳅(LDI)、保亭近腹吸鳅(PBA)、贵州爬岩鳅(BKW)和秉氏爬岩鳅(BPI)聚集在第二象限内;斑纹缨口鳅(CST)、方氏品唇鳅(PFA)和平舟原缨口鳅(VPI)聚集在第三象限;中华近原吸鳅(ESI)、长汀品唇鳅(PCT)、原缨口鳅(VST)和扁头原缨口鳅(VHO)聚集在第四象限。

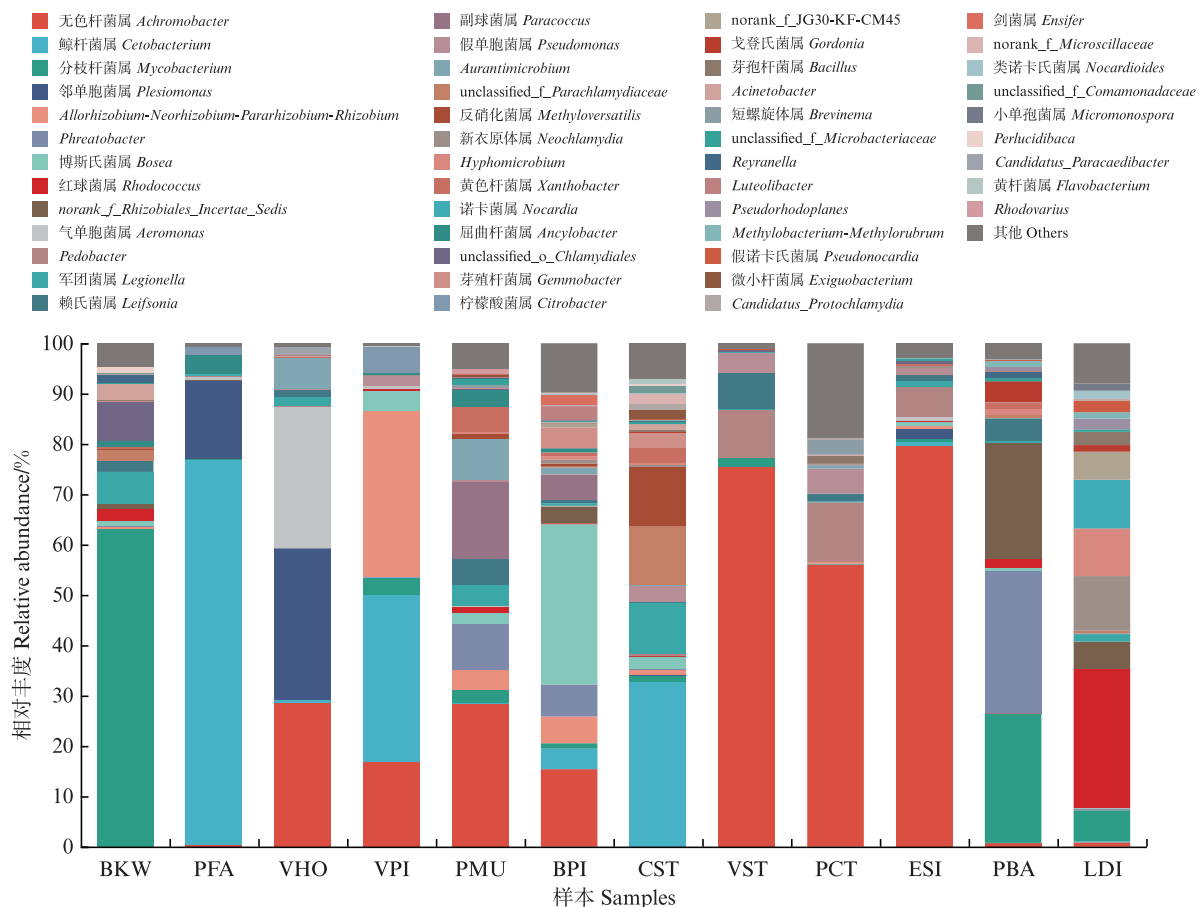


图 7 每个样本属分类水平的组成

Fig. 7 Taxonomic composition at the genus level for each sample

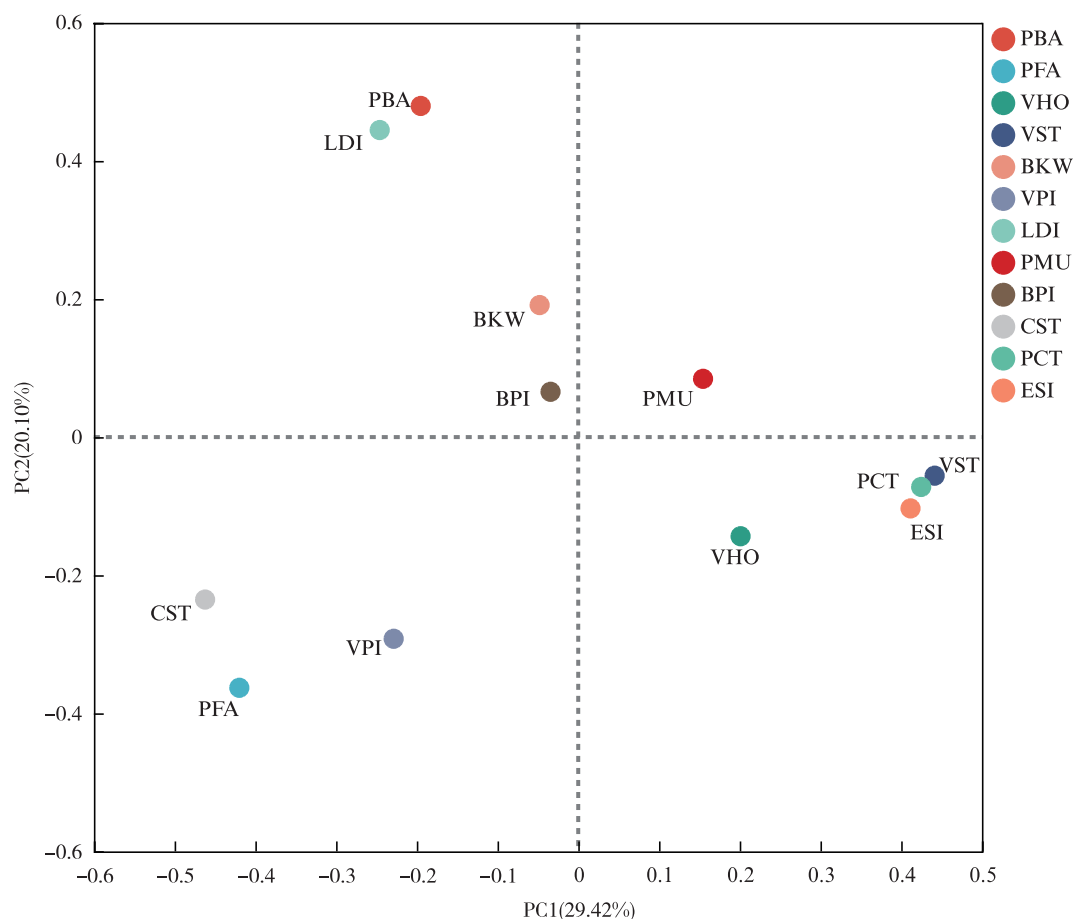


图8 OTU水平的PCoA分析图

Fig. 8 PCoA plot of OTU-level data

2.6 腹吸鳅科鱼类肠道菌群的功能预测

用PICRUST菌群代谢功能预测工具对1 029个OTU进行功能注释。从KEGG pathway 1的统计表明,肠道微生物编码的大多数基因与新陈代谢相关(表2)。对OTU进行COG功能注释,获得的OTU在COG功能水平上的注释信息及各功能在不同样本中的相对丰度信息如图9所示,菌群编码的基因中与新陈代谢功能相关的主要有氨

基酸转运与代谢(E, 11.40%)、无机离子运输和代谢(P, 7.97%)、碳水化合物运输和代谢(G, 5.61%)以及脂质转运与代谢(I, 4.07%);与环境信息处理相关的主要有能源生产和转换(C, 7.56%)及信号转导机制(T, 3.44%);与遗传信息处理相关的主要有转录(K, 6.13%)、复制、重组和修复(L, 3.97%)。

表2 KEGG pathway 1代谢通路统计

Tab. 2 Metabolic pathway statistics based on KEGG pathway 1

编号 Number	功能名称 Function	代谢通路数量 Number of metabolic pathways
1	新陈代谢 Metabolism	200466866
2	环境信息处理 Environmental information processing	18231536
3	遗传信息处理 Genetic information processing	13868280
4	细胞进程 Cellular processes	13549048
5	人类疾病 Human diseases	10529026
6	有机系统 Organismal systems	4940460

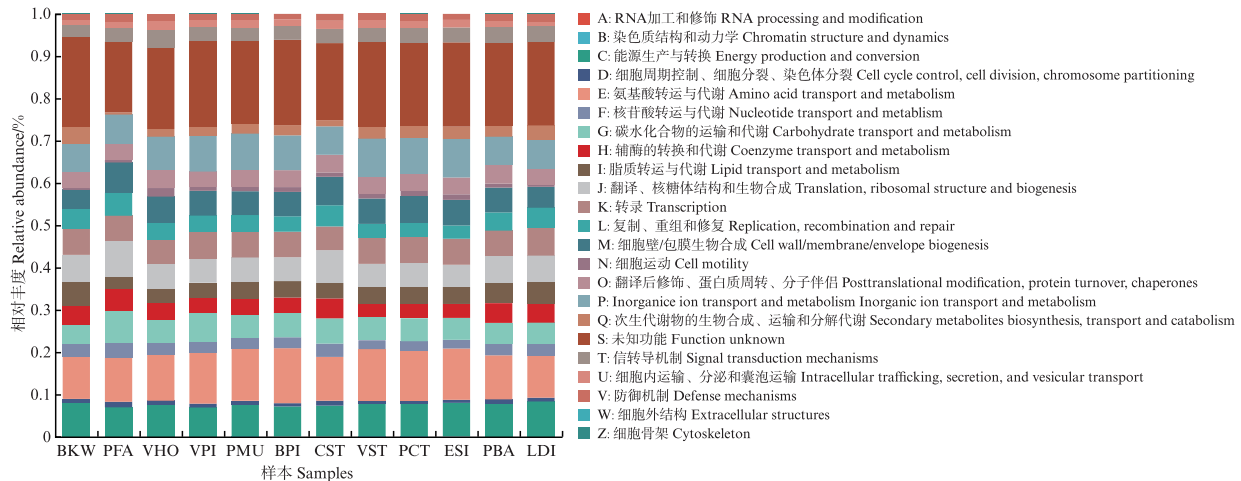


图9 各样本PICRUSt功能预测

Fig. 9 PICRUSt function functional predictions for each sample

3 讨论

3.1 腹吸鳅科鱼类肠道菌群的多样性

不同野生淡水鱼类肠道菌群的 OTU 数量不同,即使相同物种不同个体之间亦可能有较大差异。肖善势等^[18]分析了翘嘴鲌(*Culter alburnus*)、达氏鲌(*C. dabryi*)和红鳍原鲌(*Cultrichthys erythropterus*)3种鱼类肠道微生物群落结构,分别检测到407、666和392个 OTU,共有 OTU 73 个。席建宁等^[19]对纳木错裸鲤(*Gymnocypris namensis*)肠道微生物作了分析,得到598个 ASVs(Amplicon sequence variants),且不同样本之间存在显著差异。荣华等^[20]研究了云南滇池草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、高背鲫(*Carassius auratus*)、昆明裂腹鱼(*Shizothorax grahami*)和鳊(*Siniperca chuatsi*)的肠道微生物,分别检测到690、474、336和266个 OTU,共有 OTU 数达223个。柳鹏等^[21]研究了吉林牡丹江流域野生江鳊(*Lota lota*)的肠道微生物,发现不同样本间的 OTU 数量差异较大,最多为2736个,最少仅有90个,共有 OTU 为4个,但各年龄组及同龄异性之间差异均不显著。何思美等^[22]研究了洞庭湖黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、鳊、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼、鲫及翘嘴鲌的肠道微生物多样性,检测到的 OTU 数分别为22、381、69、56、237和96个。由此可见,野生鱼类肠道微生物在种间和种内差异巨大,多样性和丰度情况复杂多样。

本研究在8属12种腹吸鳅科鱼类的肠道组

织中共检测到 OTU 1 029 个,最多的秉氏爬岩鳅(BPI)349个,最少的原缨口鳅(VST)仅有34个,每种平均175个,共有 OTU 仅3个,表现出中等偏下水平的多样性和很低的共性。OTU 水平的 PCoA 分析结果显示,系统发育关系较近的物种会处在不同的象限中。所以,从以上角度来看,很难预测腹吸鳅科鱼类肠道微生物组成与系统发育^[10,12-15]之间的关联性,但符合野生鱼类肠道微生物普遍存在的多样性差异格局。

3.2 腹吸鳅科肠道菌群的功能分析

本研究12种鱼类共有的 OTU 数仅为3个,分别属于红球菌属(*Rhodococcus*)、赖氏菌属(*Leifsonia*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)。有研究表明,红球菌属能够适应水生底栖环境,具备降解石油烃、有机腈及霉菌毒素等多种有机污染物的能力,能够起到生物修复作用^[23];赖氏菌属可产生多种糖苷酶,可以进行部分糖类有机物降解合成,相关研究仍处于探索阶段^[24];分枝杆菌属广泛存在于各种水环境中,能够在土壤和水中长期存活,其中有些菌株为人畜致病菌^[25]。目前尚无研究深入探讨这3类微生物对鱼类生理生化的具体影响,亦无法明确其主要功能和作用。

本研究通过 PICRUSt 软件对腹吸鳅科鱼类肠道菌群 COG 和 KEGG 功能注释预测发现,腹吸鳅科鱼类肠道中与新陈代谢功能相关的菌群丰度最高,其中氨基酸转运与代谢、无机离子运输和代谢、碳水化合物运输和代谢以及脂质转运与代谢相关菌群占比较高,这表明腹吸鳅科鱼类肠道菌群功能与宿主的营养代谢有很大的

关联。

此外,本研究还发现部分微生物群落在绝大多数样本中均有检出且具有一定丰度,这些菌群的功能在现有文献中有所描述。有10个物种检测到鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、博斯氏菌属(*Bosea*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)。有研究表明,鲸杆菌属广泛存在于鱼类肠道中,通常具有较高丰度,通过代谢产物乙酸激活副交感神经系统,从而促进鱼类胰岛素表达和糖利用能力,对鱼体健康具有重要调控作用^[26]。博斯氏菌属则能够将砷从三价形式转换为五价形式,大幅降低其毒性,帮助鱼类进行有毒物质转化^[27]。无色杆菌属在水环境中可产生抗病毒物质^[28]。有11个物种检测到黄色杆菌属(*Xanthobacter*)和农杆菌属(*Agrobacterium*)。黄色杆菌属与鱼类的交互关系尚不明确,但有研究显示其对二噁烷及邻苯二甲酸酯等毒性有机物具有降解作用,推测其在鱼类肠道中可能具有降解有害有机物的功能^[29-30]。农杆菌属广泛存在于土壤中,主要通过侵染植物存活,与鱼类的交互关系尚不明确。

3.3 腹吸鳅科肠道菌群与食性的关系

食性是影响鱼类肠道菌群组成的重要因素之一,不同食性鱼类肠道微生物群落组成存在一些差异,这反映了宿主与微生物之间长期协调适应的结果。常见植食性鱼类如草鱼、武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)肠道中主要以柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)和纤毛菌属(*Leptotrichia*)为主^[31];杂食性鱼类如鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫则以梭菌属、鲸杆菌属和盐单胞菌属(*Halomonas*)为主^[32];而肉食性鱼类如鳅,其肠道菌群主要由假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)和乳酸杆菌属(*Limnobacter*)构成^[18]。

目前尚无腹吸鳅科鱼类食物组成的研究报告。本研究中,腹吸鳅科鱼类肠道微生物主要优势群落有无色杆菌属、鲸杆菌属、分枝杆菌属、*Allorhizobium*-*Neorhizobium*-*Pararhizobium*-*Rhizobium*、邻单胞菌属、*Bosea*等。其中多数优势群落与以上常见鱼类差别较大。但在10个物种中均检测到鲸杆菌属,且均为优势菌属,同样拥有该优势菌群的鲤和鲫均为杂食性鱼类。所以,本研究推测腹吸鳅科鱼类应该属于杂食性鱼类,但在食物组成上具有一定独特性,来源更为多样

化。胡佐灿等在研究与腹吸鳅科生态位相似的爬鳅科物种西昌华吸鳅(*Sinogastromyzon sichangensis*)和峨眉后平鳅(*Metahomaloptera omeiensis*)的食性时认为,二者均符合杂食性鱼类的特征,但前者更偏向肉食性,后者更偏向植食性^[33],这也符合本研究的观点。

3.4 溪流环境鱼类与平原河湖鱼类肠道微生物组成的差异

腹吸鳅科鱼类生活于山间溪流,其肠道微生物组成与平地河湖生态系统的鱼类相比具有一定的独特性。以同属于鲤形目的翘嘴鲇、鲤、团头鲂和鲫为例,除共有的鲸杆菌属和邻单胞菌属外,这些鱼类的优势菌群还包括气单胞菌属(*Aeromonas*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、梭菌属(*Clostridiales*)、刺骨鱼菌属(*Epulopiscium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、柠檬酸杆菌属、哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)、链球菌属(*Streptococcus*)及芽孢杆菌属(*Bacillus*)等^[5,34-35],显示出较为广泛的菌群多样性,反映出平原河湖鱼类面临更复杂的生态环境和食物资源。

溪流环境通常具有较高的水流速度和较低的有机质含量,这种环境可能会限制某些厌氧菌和嗜有机物菌群的生长,使得一些如分枝杆菌属(*Mycobacterium*)的专性需氧菌以及一些如无色杆菌属(*Achromobacter*)的偏好有氧环境的兼性厌氧菌在腹吸鳅科鱼类肠道微生物组成上占据优势地位。而大河湖泊环境则因其相对稳定的水流和丰富的有机质,更适合多样化的菌群生长,从而使平原河湖鱼类肠道菌群的多样性更高。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] RAWLS J F, SAMUEL B S, GORDON J I. 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.
- [2] 张碧云, 杨红玲, 汪攀, 等. 鱼类肠道微生物与宿主免疫系统相互作用研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61 (10): 3046-3058.
ZHANG B Y, YANG H L, WANG P, et al. Advances in the interactions between intestinal microorganisms and

- host immune system in fish [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3046-3058.
- [3] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 143-155.
- MENG X L, LI W J, NIE G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 143-155.
- [4] 高渊, 陆晨希, 袁鹏, 等. 肠道微生物与环境健康关系的研究进展与展望[J]. *环境化学*, 2021, 40(1): 1-10.
- GAO Y, LU C X, YUAN P, et al. Research progress and prospect of relationship between gut microbiota and environmental health [J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(1): 1-10.
- [5] 赵庆新. 鲤科四种鱼肠道菌群的相似性及其与系统进化的关系[J]. *遗传*, 2001, 23(5): 449-451.
- ZHAO Q X. A study of the construction of evolutionary tree of four fishes in cyprinidae by similarity values of intestinal microflora [J]. *Hereditas*, 2001, 23(5): 449-451.
- [6] 秦振宇. 草鱼和鳊鱼肠道微生物多样性分析及候选益生菌分离鉴定[D]. 广州: 华南理工大学, 2024.
- QIN Z N. Diversity analysis of intestinal microbial of grass carp and bighead carp and the isolation and identification of their candidate probiotics bacteria [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2024.
- [7] KOKOU F, SASSON G, FRIEDMAN J, et al. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish [J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2456-2465.
- [8] INGERSLEV H C, VON GERSDORFF JØRGENSEN L, LENZ STRUBE M, et al. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type [J]. *Aquaculture*, 2014, 424-425: 24-34.
- [9] LI J, NI J, LI J, et al. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(6): 1750-1760.
- [10] 陈宜瑜. 中国平鳍鳅科鱼类系统分类的研究 II. 腹吸鳅亚科鱼类的分类[J]. *水生生物学集刊*, 1980, 7(1): 95-120.
- CHEN Y Y. Systematic studies on the fishes of the family Homalopteridae of China II. Classification of the fishes of The subfamily Gastromyzoninae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1980, 7(1): 95-120.
- [11] FRICE R, ESCHMEYER W N, VAN DER LAAN R. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references [EB/OL]. 2025. <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- [12] 唐文乔, 陈宜瑜. 平鳍鳅科鱼类的分类学研究[J]. *上海水产大学学报*, 2000, 9(1): 1-10.
- TANG W Q, CHEN Y Y. Study on taxonomy of Homalopteridae [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(1): 1-10.
- [13] CHEN J C, CHEN Y Y, TANG W Q, et al. Resolving phylogenetic relationships and taxonomic revision in the *Pseudogastromyzon* (Cypriniformes, Gastromyzonidae) genus: molecular and morphological evidence for a new genus, *Labigastromyzon* [J]. *Integrative Zoology*, 2024, 19(5): 824-845.
- [14] GONG X, ZHANG E. *Bashimyzon cheni*, a new genus and species of sucker loach (Teleostei, Gastromyzontidae) from South China [J]. *Zoosystematics and Evolution*, 2024, 100(1): 309-324.
- [15] CHEN J C, LI J J, TANG W Q, et al. Taxonomic resolution of the hillstream suck-loach *Beaufortia pingi* species group (Cypriniformes, Gastromyzontidae) and two new species from Southwest China - *Beaufortia granulopinna* and *Beaufortia viridis* [J]. *Zoosystematics and Evolution*, 2024, 100(3): 941-963.
- [16] 谭刚, 吴毅, 何兴恒, 等. 侧沟爬岩鳅人工繁殖和胚胎发育初步研究[J]. *湖北农业科学*, 2019, 58(24): 150-153.
- TAN G, WU Y, HE X H, et al. Preliminary study on artificial reproduction and embryo development of *Beaufortia liui* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2019, 58(24): 150-153.
- [17] YOUSSEF N, SHEIK C S, KRUMHOLZ L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [18] 肖善势, 张爱菊, 刘金殿, 等. 千峡湖三种肉食性鱼类肠道微生物群落结构分析[J]. *水产学杂志*, 2022, 35(3): 73-79.
- XIAO S S, ZHANG A J, LIU J D, et al. Analysis on intestine microbial community structure of three carnivorous fishes in Qianxia Lake, China [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35(3): 73-79.
- [19] 席建宁, 刘丛丛, 王艳梅, 等. 青藏高原典型湖泊鱼类纳木错裸鲤肠道微生物多样性分析[J]. *工业微生物*, 2024, 54(3): 169-172.
- XI J N, LIU C C, WANG Y M, et al. Analysis on the intestinal microbial diversity in *Gymnocypris namensis*, a typical lake fish on the Qinghai Xizang Plateau [J]. *Industrial Microbiology*, 2024, 54(3): 169-172.
- [20] 荣华, 谢雨晴, 赵涛, 等. 四种不同食性鱼类肠道微生物群落组成及多样性比较分析[J]. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 75-85.

- RONG H, XIE Y Q, ZHAO T, et al. Comparative analysis of the composition and diversity of the intestinal microflora of four fishes with different feeding habits[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 75-85.
- [21] 柳鹏, 李玲雪, 闫春梅, 等. 基于16S rRNA高通量测序的江鳊肠道微生物群落结构研究[J]. *水产科技情报*, 2023, 50(1): 37-43.
- LIU P, LI L X, YAN C M, et al. Microbial community in intestine of *Lota lota* based on 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2023, 50(1): 37-43.
- [22] 何思美, 张杨军, 张可, 等. 洞庭湖地区6种鱼肠道微生物群落的多样性及组成分析[J]. *激光生物学报*, 2023, 32(2): 153-159, 169.
- HE S M, ZHANG Y J, ZHANG K, et al. The diversity and composition of gut microbiota in six species of fish from the Dongting Lake area [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2023, 32(2): 153-159, 169.
- [23] 邱孜博, 汪荣, 张杨, 等. 红球菌及其生物降解作用研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(7): 254-258.
- QIU Z B, WANG R, ZHANG Y, et al. Recent progress in studies of *Rhodococcus* and its application of in biodegradation [J]. *Food Science*, 2016, 37(7): 254-258.
- [24] 何易, 焦谿虎, 王晨曦, 等. *Leifsonia* sp. ZF2019 中一种新型耐木糖 β -木糖苷酶的表达与特征[J]. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1452-1463.
- HE Y, JIAO R H, WANG C X, et al. Expression and characterization of a novel xylose-tolerant β -xylosidase from *Leifsonia* sp. ZF2019 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1452-1463.
- [25] 张书环, 聂品, 舒少武, 等. 子二代中华鲟分枝杆菌感染及血液生理生化指标的变化[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(1): 136-145.
- ZHANG S H, NIE P, SHU S W, et al. Mycobacteriosis in cultured F_2 generation Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and relevant blood physiological and biochemical indices [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 136-145.
- [26] WANG A, ZHANG Z, DING Q, et al. Intestinal *Cetobacterium* and acetate modify glucose homeostasis via parasympathetic activation in zebrafish [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-15.
- [27] 柳朝阳, 向利, 王红梅, 等. 砷氧化菌株的筛选及 *Bosea* sp. AS-1 基因组分析[J]. *微生物学报*, 2020, 60(11): 2538-2554.
- LIU C Y, XIANG L, WANG H M, et al. Screening and genome analysis of arsenite-oxidizing strain *Bosea* sp. AS-1 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(11): 2538-2554.
- [28] 郝艳娟, 吴新民. 从河口及海洋环境中筛选具有抗病毒 IHN 能力的细菌[J]. *河北渔业*, 2004(4): 22-23.
- XI Y J, WU X M. Screening of IHN-resistant bacteria from estuarine and marine environments [J]. *Hebei Fisheries*, 2004(4): 22-23.
- [29] 王嘉翼, 樊双虎, 任超, 等. 一株黄色杆菌的分离鉴定及对邻苯二甲酸酯的降解研究[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(10): 157-164.
- WANG J Y, FAN S H, REN C, et al. Identification of newly isolated *Xanthobacter* sp. and its degradability to phthalic acid esters[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(10): 157-164.
- [30] 金小君, 陈东之, 朱润晔, 等. *Xanthobacter flavus* DT8 降解二噁烷的特性研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(5): 1657-1662.
- JIN X J, CHEN D Z, ZHU R Y, et al. Characteristics of 1, 4-Dioxane Degradation by *Xanthobacter flavus* DT8 [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(5): 1657-1662.
- [31] SAHA S, ROY R N, SEN S K, et al. 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.
- [32] LIU H, GUO X W, GOONERATNE R, et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 24340.
- [33] 胡佐灿, 解崇友, 蔡瑞钰, 等. 同域共存的两种平鳍鮠科鱼类消化系统的形态差异[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 379-387.
- HU Z C, XIE C Y, CAI R Y, et al. The morphological characteristics of the digestive system in two coexisting Balitoridae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 379-387.
- [34] 李小义, 申晓东, 张效平, 等. 从江田鱼肠道微生物多样性分析[J]. *湖北农业科学*, 2022, 61(5): 56-59, 75.
- LI X Y, SHEN X D, ZHAO X P, et al. Analysis of the bacterial diversity in the Congjiang field carp's intestine [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2022, 61(5): 56-59, 75.
- [35] 陈鹏, 孙启睿, 张宏华, 等. 基于16S rRNA 基因分析异育银鲫肠道微生物多样性[J]. *水产科学*, 2022, 41(2): 266-272.
- CHEN P, SUN Q R, ZHANG H H, et al. Intestinal microbiota analysis in Gibel Carp *Carassius auratus gibelio* based on 16S rRNA gene sequence [J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(2): 266-272.

Characterization of gut microbial communities in Gastromyzontidae fish based on 16S rRNA high-throughput sequencing

YANG Liu¹, CHEN Jingchen¹, TANG Wenqiao^{1,2}

(1. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The family Gastromyzontidae primarily inhabits mountainous streams in Southeast Asia. These fish have a flattened body shape, with broad paired fins, and in some species, the paired fins are specialized into a disc, enabling them to live in fast-flowing environments. To investigate the diversity and structure of the gut microbiota in Gastromyzontidae fish, MiSeq 16S rRNA high-throughput sequencing was conducted on gut samples from 12 species across eight genera, including *Plesiomyzon baotingensis*, *Beaufortia pingi*, *Beaufortia kweichowensis*, *Liniparhomaloptera disparis*, *Erromyzon sinensis*, *Paraprotomyzon multifasciatus*, *Labidogastromyzon fangi*, *Labidogastromyzon changtingensis*, *Vanmanenia pingchowensis*, *Vanmanenia stenosoma*, *Vanmanenia homalocephala*, and *Formosania stigmata*. The analysis focused on the number of operational taxonomic units (OTUs), microbial community composition, Alpha diversity, and functional predictions. A total of 1,029 OTUs were identified, spanning 31 phyla, 75 classes, 173 orders, 278 families, 465 genera, and 689 species, with an average of 175 OTUs per sample and three shared OTUs. In terms of community composition, the dominant bacterial phyla were Proteobacteria, Fusobacteriota, Actinobacteriota, and Verrucomicrobiota, with *Achromobacter*, *Cetobacterium*, *Plesiomonas*, *Mycobacterium* being the dominant genera. The shared genera included *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, and *Leifsonia*. Alpha diversity analysis revealed significant differences in species richness and diversity among the gut microbial communities of different fish species. *Beaufortia pingi* exhibited the highest diversity, while *Vanmanenia stenosoma* showed the lowest diversity. KEGG pathway analysis indicated that most genes encoded by the gut microbiota were related to metabolic processes, with pathways associated with amino acid transport and metabolism being the most abundant, accounting for 11.40%. From the perspective of OTU richness and PCoA analysis at the OTU level, it was difficult to predict associations between microbiota and phylogeny. Compared with fish inhabiting plains and river-lake systems, the dominant genera in Gastromyzontidae fish included obligate aerobes such as *Mycobacterium* (9.47%), as well as some facultative anaerobes that prefer aerobic environments, such as *Achromobacter* (24.91%).

Key words: 16S rRNA; gut microbiota; dominant bacterial communities; species diversity