

文章编号: 1674-5566(2024)04-0836-12

DOI: 10.12024/jsou.20240504547

中西太平洋柳叶鳎状幼体物种分子鉴定及其肠道微生物群落结构分析

曾祥标^{1,2}, 姜之信^{1,2}, 刘经纬^{1,2}, 刘必林³, 李 慷^{1,2}, 刘利平^{1,2}

(1. 上海海洋大学 中国-东盟海水养殖技术“一带一路”联合实验室(上海), 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 海洋生物资源与管理学院, 上海 201306)

摘要: 调查野生柳叶鳎状幼体肠道微生物群落结构组成和功能分析对于预测仔鱼营养需求以及开口饵料的研究具有重要的科学意义和实践价值。通过DNA条形码技术对2022年和2023年两次“淞航”号中西太平洋科考航次捕获到的柳叶鳎状幼体进行物种鉴定, 并采用16S rDNA高通量测序技术对其肠道样本进行菌群测序, 以分析肠道微生物群落结构, 识别优势菌群及其相关功能。物种鉴定结果表明, 捕获的16尾柳叶鳎状幼体中14尾鉴定至种水平, 分别为大美体鳎(*Ariosoma majus*)、科氏龟草鳎(*Thalassenchelys coheni*)、长尾突吻鳎(*Gnathophis longicauda*)、大眼锥体糯鳎(*Ariosoma megalops*)、米克氏美体糯鳎(*Ariosoma meeki*)、*Muraenidae* sp. KY17-483和带尾裸胸鳎(*Gymnothorax zonipectis*); 其他2尾只鉴定至属水平, 包括突吻鳎属(*Gymnothorax*)和裸胸鳎属(*Gnathophis*)。测序发现, 太平洋柳叶鳎状幼体肠道内的优势菌群主要是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)。在属分类水平上, 嗜冷菌属(*Psychrobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)丰度占比较高。然而, 不同物种以及不同站点之间肠道菌群结构存在一定差异。此外, 通过对肠道微生物进行功能预测发现, 代谢是相对丰度占比最高的一类。在代谢类别中, 丰度最高的均为氨基酸的转运和代谢, 说明柳叶鳎状幼体对于蛋白类物质有较高需求。本研究初步阐述了太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物菌群的多样性组成, 为柳叶鳎状幼体的摄食习惯及人工繁殖鳎仔鱼的食物组成的研究提供一定的参考。

关键词: 柳叶鳎状幼体; 肠道微生物; 高通量测序; 开口饵料; 中西太平洋

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

鳎属(*Anguilla*)目前包含了19个种, 其中日本鳎(*Anguilla japonica*)、太平洋双色鳎(*Anguilla bicolor*)以及澳洲鳎(*Anguilla australis*)等在内的16种鳎分布在太平洋^[1]。日本鳎是一种具有重要经济价值的洄游性鱼类, 其产卵场位于太平洋的西马里亚纳海沟附近^[2]。由于该鱼类洄游机制的复杂性, 其天然开口饵料至今仍是一个未解之谜, 这一难题无疑为日本鳎的人工繁殖带来了极大的挑战与阻碍。鳎属鱼类在其生命发育的初期阶段, 普遍会经历一个特殊的透明叶状幼体时期, 这一阶段被形象地称为“柳叶鳎”。关于柳叶鳎在自然环境中

的食物组成, 一直是学者们关注的焦点。深入研究柳叶鳎状幼体的食物习性, 不仅有助于我们更好地理解其生态习性, 还能能为人工繁殖鳎仔鱼时开发合适的开口饵料提供宝贵的科学依据^[3]。已有研究^[4-5]表明, 自然界中柳叶鳎状幼体的食物来源可能是海洋雪(Marine snow), 一种主要由浮游生物、有机碎屑、细菌以及粪便颗粒等多种物质组成的混合物。然而, 有关日本鳎开口饵料的研究结果仍存在分歧, 需要进一步深入探索和研究。

近年来, 高通量测序技术在水产养殖领域取得了显著的应用成果。该技术已被广泛用于大

收稿日期: 2024-05-13 修回日期: 2024-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(32072994); 国家重点研发计划(2022YFE0203900)

作者简介: 曾祥标(2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类繁殖和生理。E-mail: 2920352332@qq.com

通信作者: 刘利平, E-mail: lp-liu@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>

西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)^[6]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[7]、花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*)^[8] 等鱼类肠道微生物群结构和基因功能的研究中,并取得了突破性进展。这些研究不仅为我们深入了解鱼类肠道微生物的多样性和功能提供了重要数据,也为优化水产养殖环境、提高鱼类健康水平和生长性能提供了科学依据。肠道作为鱼类消化食物和吸收营养的核心器官,其内部的微生物群落与鱼类的物种、生境、食物来源及发育阶段等要素紧密相连,并深刻影响着宿主的生长发育、营养吸收与代谢以及免疫系统等诸多生理生化功能^[9-10]。在鱼类生长早期阶段,肠道微生物的构成主要受到开口饵料的影响。例如,在台湾泥鳅仔鱼的研究中发现,投喂不同饵料后,其肠道内的微生物优势菌群及其丰度占比呈现出显著差异^[11]。此外,不同营养需求的鱼类肠道中也拥有各自独特的微生物群落结构和优势物种组成。草食性鱼类肠道中,纤维降解菌如梭菌属 (*Clostridium*) 和柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 占据主导地位;而肉食性鱼类的肠道中,鲸杆菌属 (*Cetobacterium*) 和盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的丰度则相对较高^[12]。因此,对柳叶鳗状幼体肠道中的优势菌群及其功能的深入研究,不仅能够了解鳗鲡的摄食习性,还有助于我们在人工繁殖过程中,为他们提供更为合适的开口饵料,从而提高繁殖成功率。

为了深入探索太平洋柳叶鳗状幼体肠道菌群多样性及其食性偏好,本研究通过 DNA 条形码技术对 2022 年和 2023 年两次“淞航”号中西太平洋科考航次捕获到的柳叶鳗状幼体进行物种鉴定,并采用 16S rDNA 高通量测序技术对柳叶鳗状幼体肠道样本进行菌群测序,以分析肠道微生物群落结构,识别优势菌群及其相关功能,并进一步推测了其营养需求。研究结果不仅增进了我们对太平洋柳叶鳗状幼体肠道微生物生态的理解,也为日本鳗鲡开口饵料的研发提供了数据参考,为推动其人工繁殖技术的发展作出贡献。

1 材料与amp;方法

1.1 中西太平洋柳叶鳗状幼体的采集

本研究中所有样本采集、实验流程、研究方法均严格按照《上海海洋大学实验室动物伦理规范》和上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度

执行。

本实验采集的柳叶鳗状幼体样品是由“淞航”号科学考察船在中西太平洋海域捕获的。2022 年 6—9 月在中西太平洋 5 个不同地点 (T15, T31, T33, B2, L) 采集了 9 尾柳叶鳗状幼体;2023 年 8—9 月在中西太平洋 5 个不同地点 (T1, C9, T3, T5, T6) 采集了 7 尾柳叶鳗状幼体。采样时间以及采样站点设置参考日本鳗鲡产卵场所在地以及洄游路线所得^[2,13],具体详细信息如表 1 所示。采样拖网为四片式中层拖网,采样期间船速为 4~5 kn,匀速进行拖网作业,拖网作业时间为 2 h 左右。收集的柳叶鳗状幼体样品保存于 -80 °C 冰箱,以便后续分析。

1.2 中西太平洋柳叶鳗状幼体物种鉴定

1.2.1 基因组 DNA 提取

解冻后的柳叶鳗状幼体使用 PBS 冲洗干净,剪取 15 mg 背部肌肉置于 1.5 mL 离心管中,按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 所述步骤提取 DNA。通过核酸蛋白测定仪 NanoDrop 2000 检测 DNA 的浓度以及纯度,将质量良好的 DNA 样品放置 -80 °C 冰箱用于后续分析。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增

通过 MEGA11 软件比对 NCBI 上部分鳗鲡目物种的线粒体基因组完整序列 (表 2),依据比对结果选取合适片段并使用 Primer 6 设计引物,通过 NCBI Blast 验证引物合理性,获得最终引物 *CO I* (F: 5'-GAAGAAGGAAGCTCGGCAAAC-3'; R: 5'-TAGAAACCGACCTGGATTACTC-3')。PCR 反应体系 (25 μ L) 包括 2 \times SYBR[®] Green Pro *Taq* HS Premix II 12.5 μ L, ddH₂O 10.5 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, 样本 DNA 1 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 36 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存直至使用。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行纯化,选取合格样品送至上海生工生物有限公司进行测序。

1.2.3 数据处理

使用 NCBI Blast 工具对所获取的柳叶鳗状幼体样本 DNA 的 *CO I* 基因 PCR 扩增产物序列进行了比对。基于 BLAST 比对结果,以相似度高于 98% 为判定种类的标准来确认样品的种类归属^[14]。

表 1 中西太平洋柳叶鳗状幼体样品采样信息汇总
Tab. 1 Summary of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae samples collected

样品 Samples	采样时间 Sampling time	坐标 Coordinate	体长 Length/cm	体质量 Body mass/g
T15-1	2022.06.30	158°31'00"E;40°08'12"N	7.12	0.79
T15-2	2022.06.30	158°31'00"E;40°08'12"N	9.13	0.42
T31	2022.07.19	163°59'48"E;42°00'34"N	14.17	10.84
T33	2022.07.24	162°00'23"E;41°59'48"N	18.75	2.68
B2-1	2022.08.16	130°05'39"E;17°57'70"N	18.43	4.82
B2-2	2022.08.16	130°05'39"E;17°57'70"N	15.35	3.11
L-1	2022.09.12	133°08'31"E;14°09'90"N	17.61	2.81
L-2	2022.09.12	133°08'31"E;14°09'90"N	19.83	5.42
L-3	2022.09.12	133°08'31"E;14°09'90"N	13.55	3.18
T1	2023.08.25	129°21'16"E;17°35'16"N	17.85	2.86
C9	2023.08.31	131°00'07"E;11°00'35"N	16.73	2.55
T3	2023.09.17	136°20'02"E;15°04'15"N	24.56	7.28
T6-1	2023.09.19	130°06'07"E;19°00'17"N	18.83	5.68
T6-2	2023.09.19	130°06'07"E;19°00'17"N	17.31	5.97
G5-1	2023.09.11	134°59'35"E;12°00'27"N	7.64	1.11
G5-2	2023.09.11	134°59'35"E;12°00'27"N	8.27	1.25

注: T15, T31, T33, B2, L1, T1, C9, T3, T6, G5 为采样站点, 数字代表该站点样品编号。

Notes: T15, T31, T33, B2, L1, T1, C9, T3, T6, G5 are sampling sites, the number represents the sample number of the site.

表 2 部分鳗鲡目物种线粒体基因组序列 ID
Tab. 2 Mitochondrial genome sequence ID of some Anguilliformes fish

物种 Species	登录号 Accession number	CO I 起始位点 CO I initiation site	CO I 终止位点 CO I termination site
日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	MH_050933.1	1 968	2 684
欧洲鳗鲡 <i>Anguilla Anguilla</i>	KJ_564270.1	1 975	2 648
花鳗鲡 <i>Anguilla marmorata</i>	NC_006540.1	1 970	2 659
美洲鳗鲡 <i>Anguilla rostrata</i>	ASM1855537v3	1 973	2 659
星康吉鳗 <i>Conger myriaster</i>	MW_788427.1	1 963	2 647
海鳗 <i>Muraenesox cinereus</i>	NC_057492.1	1 965	2 641

1.3 太平洋柳叶鳗状幼体肠道微生物分析

1.3.1 肠道 DNA 提取

按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 说明书的方法提取柳叶鳗状幼体肠道 DNA, 所提 DNA 浓度和纯度经检测 (NanoDrop 2000) 合格后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。

1.3.2 高通量测序及数据分析

提取柳叶鳗状幼体肠道总 DNA 后, 以可变区 V3~V4 区域设计扩增引物 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' 进行 PCR 扩增^[15]。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Premix *Taq* 25 μ L, 338F 和 806R 引物各 1 μ L, 样品 DNA (20 ng/ μ L) 50 ng, 补充 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: <http://www.shhydxxb.com>

94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存直至使用。使用 E. Z.N.A.® Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。建库按照 NEBNext® ULTRA™ DNA Library Prep Kit for Illumina® 试剂盒标准流程进行操作, 完成后进行上机测序。下机后对原始数据 (Raw reads) 进行双端去杂、拼接和去嵌合体等质控处理, 获得有效序列 (Valid tags), 以相似度 97% 为阈值进行可操作分类单元归类 (Operational taxonomic units, OTUs)。对 OTUs 代表序列进行物种注释, 并与 Silva 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 序列信息比对, 获得生物注释。利用 Mothur (https://www.mothur.org/wiki/Download_mothur) 生成稀释曲线并计算 Alpha 多样性指数, 包括 Shannon 指数、Simpson 指数、Ace

指数和 Chao 指数。最后通过 PICRUSt2 (<http://picrust.github.io/picrust/>) 预测不同站点柳叶鳎肠道菌群功能,以上生物信息分析通过上海美吉生物医药科技有限公司在线平台 (<https://www.majorbio.com/>) 进行。

2 结果

2.1 中西太平洋柳叶鳎状幼体物种鉴定

对 16 个样品的 PCR 扩增产物测序结果进行整理后,在 NCBI GENBANK 数据库中搜索相似序列。在 2022 年捕获的 9 条柳叶鳎状幼体中有 7 个样品 CO I 基因片段序列可以在 NCBI GENBANK 数据库中找到相似性达 98% 以上的标准序列,分

别鉴定为大美体鳎 (*Ariosoma majus*)、科氏龟草鳎 (*Thalassenchelys coheni*) 和长尾突吻鳎 (*Gnathophis longicauda*); 剩余 2 条比对相似度小于 98%, 被鉴定为突吻鳎属 (*Gnathophis*) 和裸胸鳎属 (*Gymnothorax*)。2023 年捕获的 7 尾柳叶鳎状幼体样品 CO I 基因片段序列均可以在 NCBI GENBANK 数据库中找到相似性大于 99% 的标准序列, 被鉴定为大眼锥体糯鳎 (*Ariosoma megalops*)、米克氏美体糯鳎 (*Ariosoma meeki*)、大美体鳎 (*Ariosoma majus*)、海鳎科 (*Muraenidae* sp. KY17-483) 和带尾裸胸鳎 (*Gymnothorax zonipectis*), 见表 3 和图 1。

表 3 中西太平洋柳叶鳎状幼体线粒体 CO I 基因序列比对

Tab. 3 Mitochondrial CO I gene sequence comparison of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

年份 Year	样品 Samples	序列长度 Sequence length/ bp	相似度 Similarity/%	分子鉴定 Molecular identification	参考序列 Reference sequence
2022	L-2	646	99.23	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MW311321.1* MW311322.1
	L-3	650	99.54	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MW311321.1* MW311322.1
	B2-1	650	99.72	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MW311321.1* MW311322.1
	B2-2	622	99.68	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MW311321.1* MW311322.1
	T15-1	643	99.49	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MW311321.1* MW311322.1
	T31	627	99.66	科氏龟草鳎 <i>Thalassenchelys coheni</i>	DQ645716.1* JX242951.1
	L-1	648	92.48	裸胸鳎属 <i>Gymnothorax</i>	JX242978.1* JX242975.1
	T15-2	648	96.61	突吻鳎属 <i>Gnathophis</i>	DQ645704.1* JX242952.1
	T33	647	98.09	长尾突吻鳎 <i>Gnathophis longicauda</i>	DQ645704.1* JX242952.1
2023	T1	670	99.45	大眼锥体糯鳎 <i>Ariosoma megalops</i>	MH496113.1*
	C9	668	99.76	大眼锥体糯鳎 <i>Ariosoma megalops</i>	MH496115.1*
	T3	636	99.84	米克氏美体糯鳎 <i>Ariosoma meeki</i>	OR782396.1* MF539661.1
	T6-1	668	99.63	米克氏美体糯鳎 <i>Ariosoma meeki</i>	MH496100.1* MH496098.1
	T6-2	655	100.00	大美体鳎 <i>Ariosoma majus</i>	MH496100.1* MH496098.1
	G5-1	635	99.15	海鳎科 <i>Muraenidae</i> sp. KY17-483	LC439409.1*
	G5-2	651	99.42	带尾裸胸鳎 <i>Gymnothorax zonipectis</i>	AB695705.1* OP035256.1

注:*代表本研究提供。

Notes: * means that the reference sequence is provided by this study.

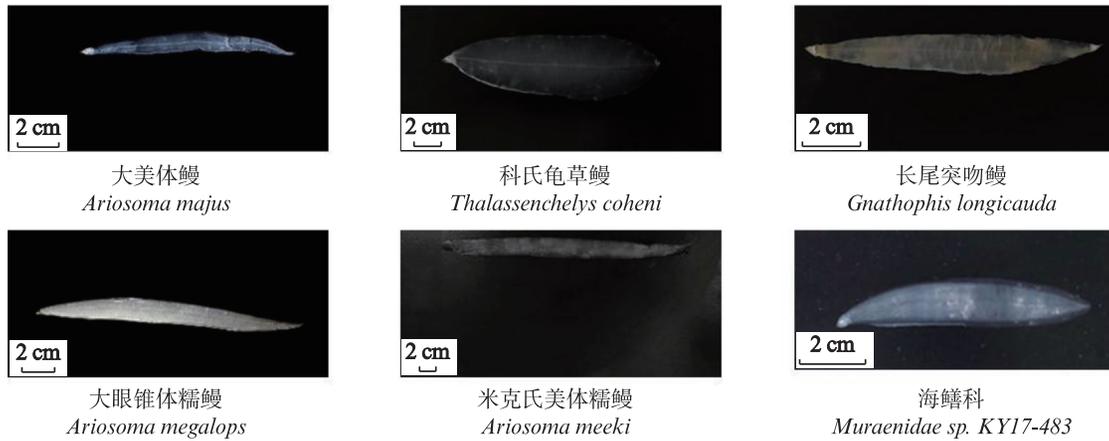


图1 中西太平洋柳叶鳎状幼体外观鉴定

Fig. 1 Appearance identification of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

2.2 肠道菌群特征分析

本研究对太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物进行高通量测序分析,结果表明(表4),2022年捕获的太平洋柳叶鳎状幼体共识别出712个OTUs,其中5个站点共享的OTUs的数量为340个。这些OTUs分属于27个门、50个纲、126个目、219个科、454个属和313个种。2023年捕获的太平洋柳叶鳎状幼体中共获得665个OTUs,它们归属于25个门、59个纲、176个目、243个科、579个属和321个种,其中站点间共享的OTUs数量为106

个。

为了评估测序数据量是否足以反映柳叶鳎状幼体肠道微生物的物种丰富度,我们采用了Alpha指数稀释曲线进行分析。当曲线趋于平坦时,表明进一步测序只会产生少量新的OTU,从而证明本次测序数据量是合理的(图2)。如表4所示,所有样品的覆盖率均超过99%,这充分证明了本次测序的数据量足够且合理,能够准确反映柳叶鳎肠道微生物的物种多样性和丰富度。

表4 中西太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物 α 多样性指数

Tab. 4 Intestinal microbial alpha diversity index of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

年份 Year	样品 Samples	香农指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	覆盖率 Coverage	分类操作单元 OTUs
2022	T15-1	2.87	0.14	283.54	280.11	0.997 6	460
	T15-2	2.99	0.14	294.14	278.59	0.996 5	810
	T31	2.46	0.16	263.69	226.86	0.998 2	622
	T33	2.61	0.16	235.11	251.28	0.999 3	637
	L-1	3.32	0.08	310.35	317.92	0.998 5	557
	L-2	3.12	0.09	281.74	312.62	0.992 2	455
	L-3	2.80	0.14	269.74	287.46	0.996 6	548
	B2-1	2.99	0.14	305.14	267.72	0.998 9	712
B2-2	2.45	0.16	260.72	273.64	0.996 7	513	
2023	T1	3.52	0.09	220.48	220.21	0.999 3	322
	C9	2.91	0.15	229.93	228.52	0.997 8	321
	T3	3.46	0.07	320.15	316.67	0.996 1	463
	T6-1	3.88	0.07	315.21	311.05	0.997 6	541
	T6-2	2.60	0.16	242.04	237.75	0.996 5	394
	G5-1	3.43	0.06	172.34	172.57	0.998 6	290
	G5-2	3.17	0.10	187.09	187.45	0.999 2	269

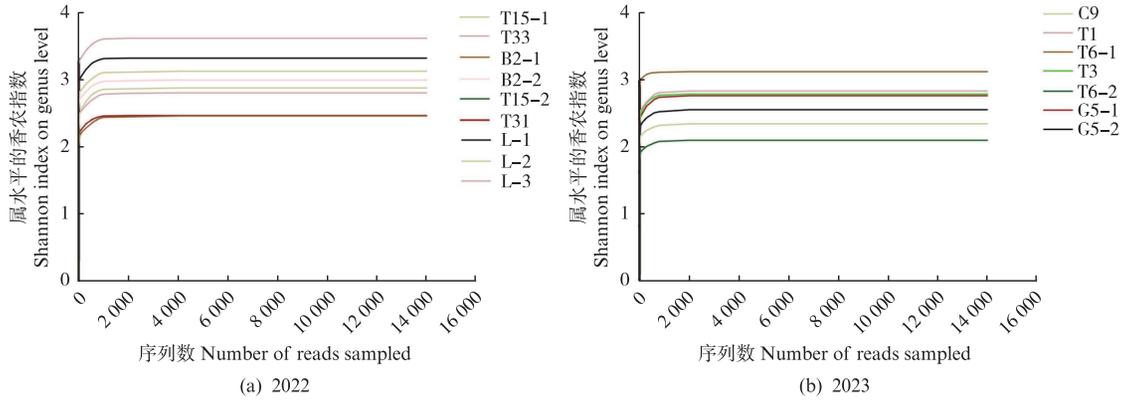


图2 中西太平洋柳叶鳎状幼体 α多样性曲线

Fig. 2 α diversity curve of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

2.3 肠道菌群组成比较

2.3.1 门水平上太平洋柳叶鳎状幼体肠道菌群的组成分析

菌门分析结果(图3)显示,中西太平洋柳叶鳎状幼体优势菌群主要是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),三者合计占所有采样点肠道菌群相对丰度的75%以上。此外,其他较为显著的

菌门包括放线菌门(Actinobacteria)、脱硫菌门(Desulfurobacteria)和螺旋体门(Spirochaetota)。在特定样本中,如大美体鳎、突吻鳎属、长尾突吻鳎、大眼锥体糯鳎、米克氏美体糯鳎、海鳎科和带尾裸胸鳎样品中,变形菌门丰度占比最高,成为这些样本中的优势菌门。然而,在裸胸鳎属和科氏龟草鳎中,厚壁菌门占据了主导地位,在该样本表现出显著优势。

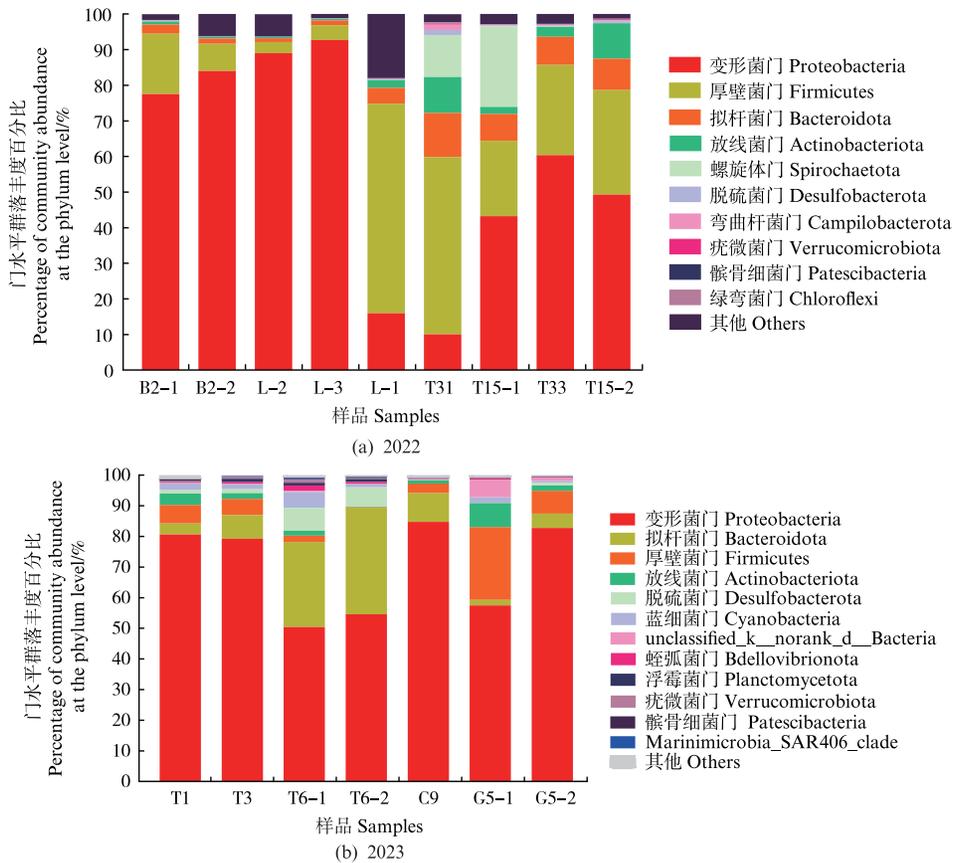


图3 中西太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物在门水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of predominant phylum of intestinal microflora of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

2.3.2 属水平上中西太平洋柳叶鳎状幼体肠道菌群的组成分析

在属水平(图4),2022年和2023年捕捞的中西太平洋柳叶鳎状幼体优势菌群主要为嗜冷菌属(*Psychrobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。嗜冷菌属在B2-1、B2-2、L-2和L-3样本中丰度占比超过50%,样本T31和T15-1中短螺旋体属(*Brevinema*)丰度占比最高,而样本T33中弧菌属(*Vibrio*)是优势菌属。样本T1中主要以嗜冷菌属和BD1-7进化枝为优势菌;样本T3和G5-1中嗜冷菌属和可变单胞菌属(*Alteromonas*)是主要优势菌属;样本T6-1和T6-2中嗜冷菌属、海胞菌属(*Marinicella*)和海黄单胞菌属(*Marixanthomonas*)

的丰度占比较大;不动杆菌属在样本C9中是优势菌属。

2.4 肠道菌群功能预测

通过PICRUST2工具对中西太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物进行了深入的功能预测分析(图5)。在一级功能分类层面,2022年采集的太平洋柳叶鳎样品肠道菌群的预测功能主要集中于代谢(Metabolism)、细胞加工(Cellular processes and signaling),以及信息存储和处理(Information storage and processing)3个方面。而2023年采集的柳叶鳎样品肠道菌群功能预测主要富集在代谢(Metabolism)、遗传信息处理(Genetic information processing)以及细胞过程(Cellular processes)。

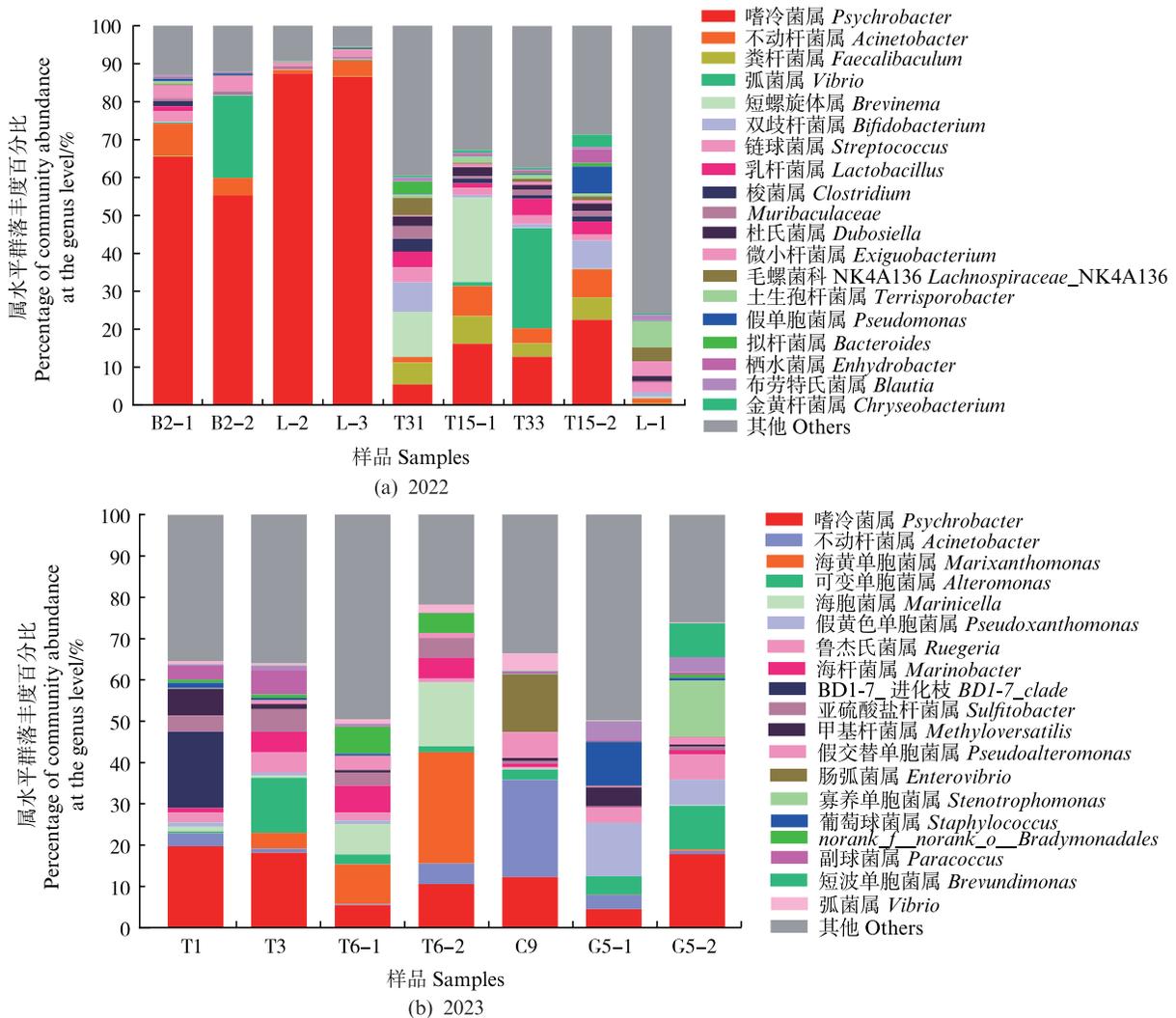


图4 中西太平洋柳叶鳎状幼体肠道微生物在属水平相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of predominant genus of intestinal microflora of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

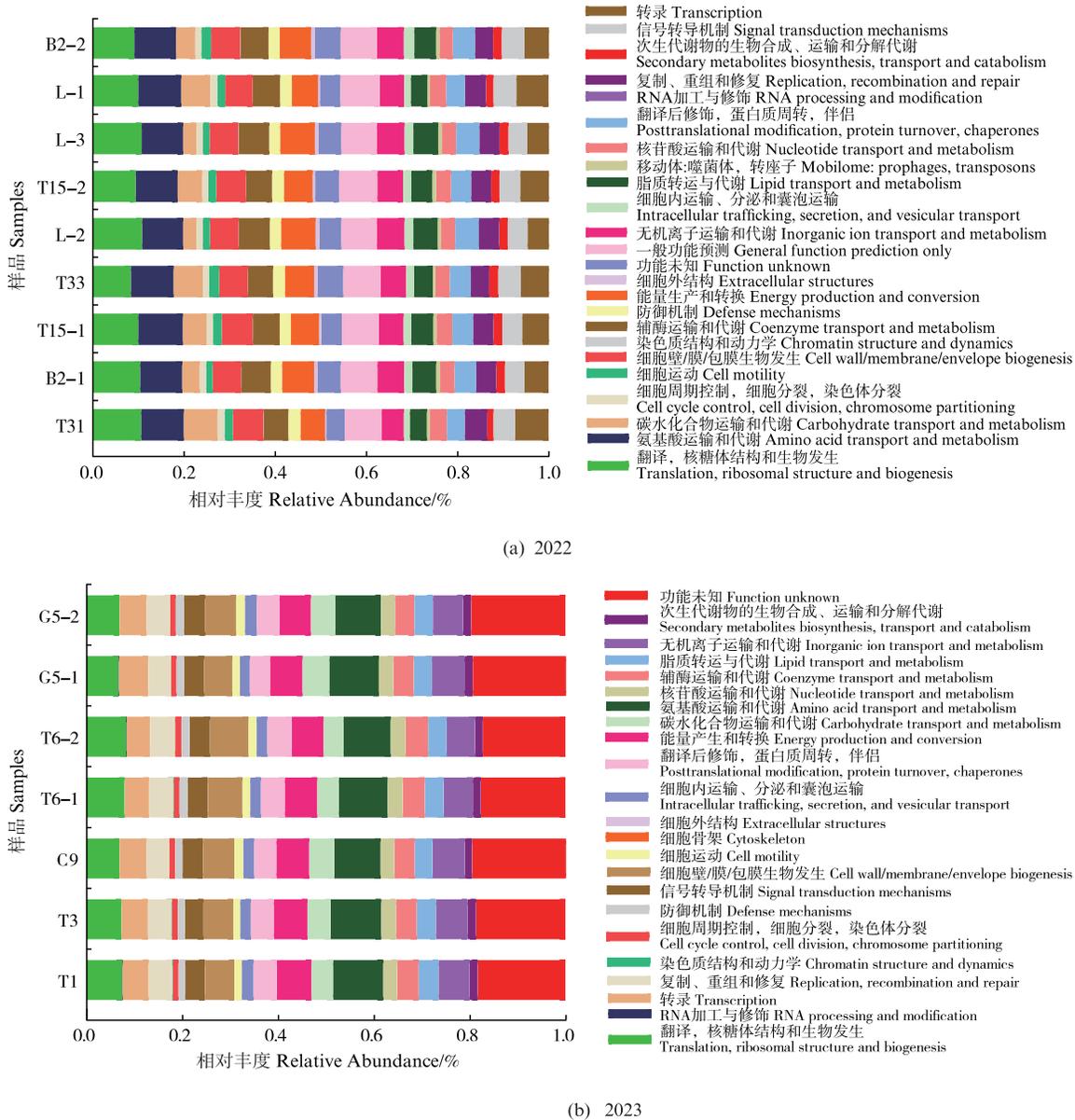


图5 中西太平洋柳叶鳗状幼体肠道微生物功能预测图

Fig. 5 Prediction of intestinal microbial function of Western and Central Pacific Ocean leptocephalus larvae

进一步对肠道中相对丰度大于0.01%的菌群进行功能注释和聚类后,两年采集的样品分别获得了24和23个功能类别(图5)。特别值得注意的是,在代谢类别中,所有样品均展现出氨基酸运输和代谢(Amino acid transport and metabolism)功能的相对丰度最高,其次是脂质的转运和代谢(Lipid transport and metabolism),而碳水化合物的转运和代谢(Carbohydrate transport and metabolism)的相对丰度则较低的现象。

3 讨论

“淞航”号于2022年与2023年采集的16尾柳

叶鳗状幼体经物种鉴定后,结果显示,包含大美体鳗6尾、科氏龟草鳗1尾、大眼锥体糯鳗2尾、米克氏美体糯鳗2尾、长尾突吻鳗1尾、*Muraenida* sp. KY17-483 1尾和带尾裸胸鳝1尾;剩余2尾只鉴定至属水平。研究发现日本鳗鲡在马里亚纳群岛以西的海山附近有一个产卵场(142°E~143°E, 14°N~17°N),预估产卵时间为6月^[2]。根据产卵时间(6月)、洄游洋流平均流速(25 cm/s)以及到达大陆时间(1月)计算所得^[2,13,16],日本鳗鲡柳叶鳗活动范围大致为130°E~135°E,10°N~18°N,因此设置相关采样站点。本研究中采样站点与前人报道的站点重合度较高^[16]。但鉴定结果显示,

本实验未获得日本鳗鲡柳叶鳗样品,这可能与其野生资源的急剧下降有关^[17],后续可通过设置更多采样站点增大样品获得概率。

本研究发现,不同采样点的太平洋柳叶鳗状幼体肠道菌群以变形菌门和厚壁菌门为主要优势菌门。这一发现与日本鳗鲡玻璃鳗^[18]、日本鳗鲡成鳗^[19]和欧洲鳗鲡成鳗^[20]的研究结果相似,显示出鳗鲡肠道微生物组成具有一定的共性。然而,王悦等^[21]发现在花鳗鲡的肠道菌群中,梭杆菌门和厚壁菌门占据了较大比例(>75%)。在美洲鳗玻璃鳗的肠道菌群中,厚壁菌门是主要的优势菌门(83%),变形菌门的丰度则相对较低(11%)^[22]。这些差异表明,尽管鳗鲡类群之间存在一些微生物组成的共性,但不同鳗鲡物种的肠道菌群仍展现出显著的多样性。厚壁菌门和拟杆菌门具有影响宿主新陈代谢的作用^[23]。厚壁菌门的部分细菌能够促进宿主对食物的消化,而拟杆菌门菌群则主要发挥促进糖类代谢与运输的作用,为宿主的生长和发育提供能量^[24]。

本研究中,相较于大美体鳗,裸胸鳝属、科氏龟草鳗和长尾突吻鳗肠道菌群中变形菌门丰度占比有所下降,而厚壁菌门明显增多,这可能与其生境和物种特异性差异有关。测序结果显示,太平洋柳叶鳗状幼体肠道中的变形菌门主要包括嗜冷菌属和不动杆菌属等,其中大美体鳗中嗜冷菌属占比最高(55.3%~86.6%)。研究报道,在马里亚纳海沟捕获的钩虾肠的绝对优势菌群为嗜冷菌属,说明嗜冷菌在马里亚纳海沟附近海域分布广泛,为主要优势菌^[25]。嗜冷菌易在低温环境下成为优势菌群^[26],丰度占比较高的嗜冷菌属可能在柳叶鳗适应深渊低温上起到重要作用。嗜冷菌在鱼类消化吸收中发挥重要作用,主要分泌脂酶和蛋白酶^[27]。常亚娟等^[28]研究结果显示,长江口捕获的日本鳗鲡玻璃鳗的肠道菌群主要为嗜冷杆菌属和假单胞菌属,功能预测主要富集在营养代谢上,该作者推测日本鳗鲡幼鱼的营养需求主要集中在蛋白类物质,但也需要一定碳水化合物和脂类物质,这与本研究结果比较相符。不动杆菌属在本研究中丰度占比仅次于嗜冷菌属。IIDA等^[29]在一项日本鳗鲡玻璃鳗饵料投喂实验中发现,摄食后的鳗鲡肠道菌群不动杆菌属和气单胞菌属占比上升,推测不动杆菌属在鳗鲡的消化吸收中发挥一定作用。不动杆菌属某些

菌种与鳗弧菌存在拮抗作用,能有效预防鳗苗感染病原菌^[30]。此外,其还具有产生胞外蛋白酶的能力,能有效促进机体对蛋白质的吸收^[30]。几项关于太平洋柳叶鳗的研究发现,柳叶鳗肠道内容物与海雪的组成成分包含浮游动物(纤毛虫和桡足类)、磷虾和浮游植物(隐藻类和硅藻类)等物质,说明柳叶鳗对于动物蛋白有较高需求^[4,31]。PICRUS2功能预测中氨基酸的转运和代谢占比最高也印证了此观点。而碳水化合物转运与代谢也在肠道菌群功能预测结果中被发现,说明浮游植物也可能是柳叶鳗的食物来源,这可能与其营养级有关^[32]。

肠道菌群作为一种动态多变且成分丰富的微生物群落,对宿主的营养代谢、肠道健康以及免疫调节均起到十分关键的调控作用^[33]。在本研究中,肠道功能分析结果显示(图5),太平洋柳叶鳗状幼体肠道菌群功能集中在氨基酸转运与代谢以及能量产生与转化。这一发现表明其肠道菌群积极参与新陈代谢活动,与大多数鱼类肠道微生物功能组成的研究结果相契合。

研究报道,日本鳗鲡初孵仔鱼中胰蛋白酶的基因表达水平显著高于淀粉酶和脂肪酶,这暗示蛋白质在鳗鲡仔鱼中的营养需求中相较于脂质和碳水化合物更为重要^[34]。当使用脱脂鲨鱼卵(总脂肪26.3%)、鲨鱼卵(总脂肪40.4%)、脱脂鸡蛋黄(总脂肪31.5%)和鸡蛋黄(总脂肪44.3%)等不同脂质含量的饵料喂养鳗鲡初孵仔鱼时,脱脂鲨鱼卵组(总脂肪26.3%)的鳗鲡存活率和生长速度均表现最优,而鸡蛋黄组(总脂肪44.3%)的存活率最低,这一结果进一步支持了减少膳食脂质对鳗鱼幼体具有积极影响的观点^[35]。综合以上信息,我们可以推断鳗鲡仔鱼的营养需求呈现出高蛋白、低脂质的特征。因此,针对日本鳗鲡仔鱼的营养需求,我们可以设计含有较高蛋白质含量且脂质含量较低的开口饵料。此外,为了进一步提升鳗鲡的消化吸收能力,我们还可以考虑从消化道中分离培养核心菌群,并在开口饵料中针对性地添加这些益生菌。这种方法有望通过优化肠道微生物组成和功能,增强鳗鲡仔鱼的营养摄入从而提高存活率。

目前有关柳叶鳗状幼体肠道微生物的研究尚未被报道,本研究提供了重要的数据资料;同时,本实验通过对太平洋柳叶鳗状幼体的肠道微

生物进行测序,发现其主要以嗜冷菌和不动杆菌为核心菌群。根据功能预测结果推测,该生长阶段可能摄取蛋白质含量较高的天然饵料,对脂类物质及碳水化合物需求量较低。本研究为柳叶鳗的营养需求及人工繁殖鳗鲡仔鱼的开口饵料的研究提供一定的参考。

本研究的柳叶鳗状幼体样品采集得到了上海海洋大学海洋生物资源与管理学院胡贯宇老师以及“淞航”号全体成员的大力帮助,特此一并致谢。

参考文献:

- [1] HAMIDOGHLI A, BAE J, WON S, et al. A review on Japanese eel (*Anguilla japonica*) aquaculture, with special emphasis on nutrition [J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2019, 27(2): 226-241.
- [2] TSUKAMOTO K. Spawning of eels near a seamount [J]. *Nature*, 2006, 439(7079): 929-929.
- [3] 蒋天宝, 刘利平, 高晓阳, 等. 日本鳗鲡人工繁育研究的进展 [J]. *水产科技情报*, 2011, 38(3): 121-127.
JIANG T B, LIU L P, GAO X Y, et al. Advances in artificial propagation of Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2011, 38(3): 121-127.
- [4] CHOW S, INABA N, NAGAI S, et al. Molecular diet analysis of Anguilliformes leptocephalus larvae collected in the western North Pacific [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225610.
- [5] AYALA D J, MUNK P, LUNDGREEN R B C, et al. Gelatinous plankton is important in the diet of European eel (*Anguilla anguilla*) larvae in the Sargasso Sea [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6156
- [6] GAJARDO K, RODILES A, KORTNER T M, et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 30893.
- [7] WONG S, WALDROP T, SUMMERFELT S, et al. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 4974-4984.
- [8] HSU H Y, CHANG F C, WANG Y B, et al. Revealing the compositions of the intestinal microbiota of three Anguillid eel species using 16S rDNA sequencing [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(7): 2404-2415.
- [9] CHEN Z W, JIN X K, GAO F X, et al. Comparative analyses reveal sex-biased gut microbiota in cultured subadult pufferfish *Takifugu obscurus* [J]. *Aquaculture*, 2022, 558: 738366.
- [10] 周振旗, 关伟晔, 谢昕洋, 等. 中华绒螯蟹 3 种亲本规格子代的生长、肠道微生物菌群和代谢组学分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2024, 33(1): 43-52.
GAO Z Q, GUAN W Y, XIE X Y, et al. Studies on growth, metabolomics and intestinal microbes of offspring from the three parental standards of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2024, 33(1): 43-52.
- [11] 蔡澳香. 泥鳅配合饲料对台湾泥鳅仔鱼肠道菌群的影响 [D]. 湘潭: 湖南科技大学, 2021.
CAI A X. Effects of compound feed on intestinal microflora of juvenile *Paramisgurnus dabryanus* ssp. [D]. Xiangtan: University of Science and Technology of Hunan, 2021.
- [12] 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.
- [13] HAN Y S, HSIUNG K M, ZHANG H, et al. Dispersal characteristics and pathways of Japanese glass eel in the East Asian Continental Shelf [J]. *Sustainability*, 2019, 11(9): 2572.
- [14] KO H L, WANG Y T, CHIU T S, et al. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53451.
- [15] HOVDA M B, LUNESTAD B T, FONTANILLAS R, et al. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2007, 272(1/4): 581-588.
- [16] TSUKAMOTO K, CHOW S, OTAKE, T, et al. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature communications*, 2011, 2(1): 179.
- [17] ITAKURA H, KITAGAWA T, MILLER M J, et al. Declines in catches of Japanese eels in rivers and lakes across Japan: have river and lake modifications reduced fishery catches [J]. *Landscape and Ecological Engineering*, 2015, 11(1): 147-160.
- [18] 姜之信, 李慷, 巴旭冰, 等. 中国近海洄游日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 玻璃鳗肠道微生物菌群分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2023, 54(6): 1728-1736.
JIANG Z X, LI K, BA X B, et al. Analysis of intestinal microflora of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in migration along China offshore [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2023, 54(6): 1728-1736.
- [19] ZHU P, WONG M K S, LIN X, et al. Changes of the intestinal microbiota along the gut of Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 73(4): 529-541.
- [20] BERTUCCI A, HOEDE C, DASSIÉ E, et al. Impact of environmental micropollutants and diet composition on the

- gut microbiota of wild European eels (*Anguilla anguilla*) [J]. *Environmental Pollution*, 2022, 314: 120207.
- [21] 王悦, 赵盼月, 陈学豪, 等. 精养池模式下不同生长速度花鳗鲡的肠道菌群比较研究[J]. *饲料工业*, 2021, 42(4): 48-52.
- WANG Y, ZHAO P Y, CHEN X H, et al. The comparative research on intestinal flora of *Anguilla marmorata* with different growth rates under intensive culture ponds condition[J]. *Feed Industry*, 2021, 42(4): 48-52.
- [22] 刘海姿, 梁英, 翟少伟. 不同开口饵料对美洲鳗鲡白仔苗肠道菌群的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(5): 51-55.
- LIU H Z, LIANG Y, ZHAI S W. Effect of different starter feeds on intestinal flora of *Anguilla rostrata* at Elver stage [J]. *Feed Research*, 2021, 44(5): 51-55.
- [23] 张凯军, 姜鹏飞, 王军, 等. 不同温度对中华绒螯蟹生长及肠道微生物菌群的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(2): 384-393.
- ZHANG K J, JIANG P F, WANG J, et al. Effects of different temperatures on growth and gut microbiota of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(2): 384-393.
- [24] 吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(2): 611-621.
- WU J F, XIONG J B, WANG X, et al. Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(2): 611-621.
- [25] 耿道强, 产久林, 潘彬彬, 等. 三种深渊钩虾肠道微生物组成与群落结构[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(1): 83-91.
- GENG D Q, CHAN J L, PAN B B, et al. Gut microbiome composition and community structure of three hadal amphipod species [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(1): 83-91.
- [26] 王建建, 高权新, 张晨捷, 等. 野生与养殖银鲳消化道菌群结构中产酶菌的对比分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(11): 1899-1909.
- WANG J J, GAO Q X, ZHANG C J, et al. Comparative analysis of enzyme-producing bacteria in the digestive tract flora of wild and breeding silver pomfret [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1899-1909.
- [27] 崔林青, 曾琦, 石松标, 等. 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 L Q, ZENG Q, SHI S B, et al. Microbial diversity in gastrointestinal tract of wild *Grammolites scaber* collected from the Pearl River Estuary [J]. *Microbiology*, 2022, 49(11): 4567-4585.
- [28] 常亚娟, 唐文乔, 郭弘艺. 基于16S rRNA高通量测序的长江口日本鳗鲡幼体肠道微生物群落研究[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(6): 699-710.
- CHANG Y J, TANG W Q, GUO H Y. Study on the intestinal microbial community of Japanese eel larvae in the Yangtze River Estuary based on 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(6): 699-710.
- [29] HIDA T, YAMAMOTO A, WAKABAYASHI H. Changes in intestinal flora of the juvenile eel, *Anguilla japonica*, after beginning to feed [J]. *Fish Pathology*, 1984, 19(3): 201-204.
- [30] SPANGGAARD B, HUBER I, NIELSEN J, et al. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout [J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(12): 755-765.
- [31] WATANABE T, NAGAI S, KAWAKAMI Y, et al. 18S rRNA gene sequences of leptocephalus gut contents, particulate organic matter, and biological oceanographic conditions in the western North Pacific [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5488.
- [32] MILLER M J, MAROHN L, WYSUJACK K, et al. Morphology and gut contents of anguillid and marine eel larvae in the Sargasso Sea [J]. *Zoologischer Anzeiger*, 2019, 279: 138-151.
- [33] ZHANG M L, SHAN C J, TAN F, et al. Gnotobiotic models: powerful tools for deeply understanding intestinal microbiota-host interactions in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734800.
- [34] SHIN M G, RYU Y, CHOI Y H, et al. Ontogenetic digestive physiology and expression of nutrient transporters in *Anguilla japonica* larvae [J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 25: 101218.
- [35] FURUITA H, MURASHITA K, MATSUNARI H, et al. Decreasing dietary lipids improves larval survival and growth of Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(3): 581-587.

Identification of the leptocephalus larvae in Western and Central Pacific Ocean and their intestinal microbiome structure analysis

ZENG Xiangbiao^{1,2}, JIANG Zhixin^{1,2}, LIU Jingwei^{1,2}, LIU Bilin³, LI Kang^{1,2}, LIU Liping^{1,2}

(1. China-ASEAN Belt and Road Joint Laboratory on Mariculture Technology (Shanghai), 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; 3. College of Marine Living Resource Sciences and Management, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Investigating the composition and functional analysis of the intestinal microbiome of wild leptocephalus larvae has significant scientific and practical value for predicting their nutritional needs and developing appropriate initial diet. The study identified the species of leptocephalus larvae captured during the 2022 and 2023 scientific expeditions of the "Songhang" research vessel in Western and Central Pacific Ocean using DNA barcoding technology. Additionally, 16S rDNA high-throughput sequencing was employed to sequence the intestinal samples of the leptocephalus larvae, aiming to analyze the intestinal microbial community structure and identify dominant microflora and their related functions. Results showed that 14 of 16 captured leptocephalus larvae were identified to the species level, including *Ariosoma majus*, *Thalassenchelys coheni*, *Ariosoma megalops*, *Gnathophis longicauda*, *Ariosoma meeki*, *Muraenidae* sp. KY17-483, and *Gymnothorax zonipectis*. The other two leptocephalus larvae were identified to the genus level, *Gymnothorax* and *Gnathophis*. Sequencing revealed that the dominant bacterial groups in the intestinal microbiota of pacific leptocephalus larvae were Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. At the genus classification level, *Psychrobacter* and *Acinetobacter* exhibited relatively high abundance. However, there were some differences in the intestinal microbiota between different species and sampling sites. Furthermore, functional prediction analysis showed that intestinal microbiota involved in metabolism had the highest relative abundance, and functional pathways related to 'amino acid transport and metabolism' were the most enriched. These data suggested that leptocephalus larvae have a higher demand for protein. Our results preliminarily elucidated the diverse composition of the intestinal microbiota in leptocephalus larvae, providing a reference for studying their feeding habits and the development of starter feeds during the artificial breeding of Japanese eels.

Key words: Leptocephalus larvae; intestinal microbiota; high-throughput sequencing; initial diet; Western and Central Pacific Ocean