

盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群的影响

蔡小雨^{1,2}, 徐静雯^{1,2}, 张世勇², 刘洪岩², 陈校辉², 钟立强²

1. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017

摘要: 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 是我国盐碱池塘养殖的重要品种, 盐度作为关键环境因子, 其对斑点叉尾鲷肠道菌群的影响机制尚不明确。为探究盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群的影响, 实验设置 4 个盐度梯度: 对照组 (S0, 0)、低盐组 (S3, 3‰)、中盐组 (S6, 6‰) 和高盐组 (S9, 9‰), 进行为期 8 周的养殖实验。养殖期间, 每 2 周采集 1 次肠道内容物, 通过 16S rRNA 测序技术分析肠道菌群组成和功能。结果显示, 随着盐度的增加, 肠道菌群丰富度上升, 但多样性显著下降。在门水平上, 优势菌群为变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门、拟杆菌门、蓝藻门和放线菌门。对照组及中、低盐度组中, 肠道菌群呈现出明显的节律性变化, 以 2 周为周期在变形菌门与厚壁菌门、梭杆菌门、拟杆菌门间规律性波动, 而高盐度组则破坏了这种变化节律, 表现为变形菌门持续占优势的稳定状态。同时, 高盐度条件下, 肠道菌群功能也发生了显著变化, 脂肪酸代谢与降解、维生素和氨基酸降解以及能量代谢等功能丰度显著升高, 核苷酸错配、切除和修复等遗传修复功能显著降低。研究表明, 高盐度导致斑点叉尾鲷产生了强烈应激反应, 增加了能量消耗, 最终引起肠道菌群结构和功能的适应性改变。建议在盐碱地开展斑点叉尾鲷养殖时应加强养殖管理, 适当提高饲料能量水平, 并补充益生菌群以维持肠道菌群平衡。

关键词: 斑点叉尾鲷; 肠道菌群; 盐度; 节律; 16S rRNA 测序技术

中图分类号: S 965

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effect of salinity on intestinal flora of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

CAI Xiaoyu^{1,2}, XU Jingwen^{1,2}, ZHANG Shiyong², LIU Hongyan², CHEN Xiaohui², ZHONG Liqiang²

1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China

Abstract: Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is an important species cultured in saline-alkali water in China. Salinity is a key environmental factor, but the mechanism of its influence on the intestinal flora of *I. punctatus* is not clear. To investigate the effect of salinity on the intestinal flora of *I. punctatus*, we designed an eight-week experiment and divided the fish into four groups: control group (S0, salinity 0), low-salt group (S3, salinity 3‰), medium-salt group (S6, salinity 6‰), and high-salt group (S9, salinity 9‰). The intestinal contents of fish were collected every two weeks, and the composition and function of the intestinal flora were analyzed by 16S rRNA sequencing. The results show that with the increase of salinity, the richness of the intestinal flora increased, but the diversity decreased significantly. On phylum level, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteriota, Bacteroidetes, Cyanobacteria and Actinobacteria were the dominant bacterial phyla. In the control, low-salt and medium-salt groups, the intestinal flora showed rhythmic changes in the 2-week cycle, regularly repeating between Proteobacteria and Firmicutes, Fusobacteriota, Bacteroidetes. In contrast, the high salinity group disrupted the rhythm of changes, showing a main-

收稿日期: 2025-01-04; 修回日期: 2025-02-10

基金项目: 国家特色淡水鱼产业技术体系 (CARS-46); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32002378)

作者简介: 蔡小雨 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类健康养殖。E-mail: 18136877121@163.com

通信作者: 钟立强 (1985—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为鱼类绿色养殖。E-mail: stevezhong1985@163.com

tenance of the predominance of Proteobacteria. Meanwhile, the functions of the intestinal flora also changed significantly in high-salinity condition, with significantly higher functional abundance in fatty acid metabolism and degradation, vitamin and amino acids degradation, and energy metabolism, and a significant decrease in the genetic repair functions such as mismatch repair, nucleotide excision repair. High salinity caused strong stress in *I. punctatus*, increased energy expenditure, and ultimately altered the composition and function of the intestinal flora. Therefore, it is recommended to culture *I. punctatus* in saline ponds, which requires higher energy and probiotic supplementation in feed.

Keywords: *Ictalurus punctatus*; Intestinal flora; Salinity; Rhythm; 16S rRNA sequencing technology

斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 原产于北美洲, 其生长速度快, 环境适应能力强, 营养全面、无肌间刺, 是美国养殖产量最大的淡水鱼类^[1]。上世纪 80 年代引入中国后, 其养殖规模持续攀升, 现已成为我国重要的特色淡水鱼类品种, 年产量超 44 万吨^[2]。中国鲇鱼产业已经实现弯道超车, 成为世界第一的斑点叉尾鲷养殖和消费国^[3]。我国华东地区沿海盐碱地池塘面积超 3.5 万公顷, 其中斑点叉尾鲷养殖面积约占 1/3, 形成了沿海集中连片规模化养殖集群^[4]。同时, 河南、陕西、宁夏黄河沿岸以及新疆等地区盐碱地也有相当规模的斑点叉尾鲷养殖^[5]。这些盐碱地养殖池塘的盐度通常在 2‰~12‰ 之间^[5-6]。盐度是水域生态系统中重要的环境因子, 可以显著影响鱼类的生长、渗透压、生殖发育、代谢及非特异性免疫^[7-8]。与此同时, 盐度还是水体微生态系统的重要塑造者, 能够显著改变水体藻类和微生物的组成、多样性以及它们之间的相互作用^[9-10]。

肠道菌群数量巨大、组成丰富, 被称为宿主机体内的“第二基因组”^[11]。它们通过其固有结构和代谢产物可以与宿主建立“肠-脑”轴的双向调节, 从而对宿主的免疫、代谢等功能起到重要作用^[12]。肠道菌群的组成和功能也会受到宿主饮食、疾病等多重因素的影响。而盐度会通过渗透压的胁迫, 改变鱼类代谢、发育等生理生化过程, 进而影响其肠道菌群的组成^[13-14]。青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 的生殖洄游盐度波动模拟表明, 高盐度胁迫会改变肠道菌群组成, 并显著抑制优势菌群的丰度^[13]。广盐性的弓背青鳉 (*Oryzias latipes*) 在高盐度条件下, 大量运动时间显著增加, 肠道菌群结构发生了改变, 多样性也显著增加^[14]。同时, 鱼类消化道相对较短, 其肠道菌群更容易从水环境中获取微生物, 并改变肠道菌群的结构^[15]。在养殖实践中, 使用不同种类的肥料肥水能够增加草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肠道中芽孢杆菌 (*Bacillus*)

和乳球菌 (*Lactococcus*) 的含量^[16], 提高斑点叉尾鲷肠道乳酸菌的含量, 并显著降低肠道中致病菌链球菌 (*Streptococcus*) 的含量^[17]。因此, 盐度可显著改变水体藻类和微生物的组成, 也会通过环境微生物的摄入间接影响鱼类肠道菌群。

研究显示, 斑点叉尾鲷的盐度耐受性随个体发育阶段的变化而改变, 成鱼养殖阶段最高可耐受 13‰~15‰ 的盐度^[18]。该品种已经在我国不同区域的盐碱地池塘开展养殖, 适当提高养殖水体盐度, 不仅显著提高了成活率, 降低了病害发生率, 还对肌肉品质的提升和土腥味的去除发挥了积极作用^[19-20]。盐碱地养殖开辟了水产养殖的新空间, 降低了土地的盐碱度, 对保障农业多元化生产安全、推动乡村振兴战略实施以及储备后备土地资源具有重要意义。目前斑点叉尾鲷已成为盐碱地水产养殖的重要品种。然而, 在高盐度养殖条件下, 该鱼也出现了生长减缓、脂肪含量降低、病害集中暴发以及死亡率上升等问题。迄今关于盐度对斑点叉尾鲷影响的研究主要集中在生理学、遗传学^[5,19,21-22]及环境微生物学^[6,20]等方面。尽管肠道菌群在鱼类代谢和免疫等方面的作用日益受到关注, 但盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群的影响仍未见报道。为此, 本研究通过设置不同盐度梯度, 探究盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群组成和多样性的影响, 重点阐明高盐度对肠道菌群的胁迫机制, 并提出相应的对策, 以缓解盐碱地养殖斑点叉尾鲷的应激反应, 提高养殖效率和产量, 推动盐碱水域资源的可持续利用。

1 材料与方法

1.1 实验设置

本实验在国家级斑点叉尾鲷遗传育种中心扬中基地开展。盐度养殖实验在室外水泥池进行, 水泥池规格为 2 m×2 m×1 m, 实验鱼种来自斑点叉尾鲷遗传育种中心, 平均规格为每尾 103 g。实验

设置 4 个盐度梯度：对照组 (S0, 0)、低盐组 (S3, 3‰)、中盐组 (S6, 6‰) 和高盐组 (S9, 9‰)，每组 3 个平行。每个水泥池内放入鱼种 30 尾，安置曝气头，保证溶氧充足，每日早晚投喂 2 次配合饲料 (蛋白质质量分数为 35%)，日投喂量约为鱼体质量的 4%。鱼种入池暂养 1 周后，加入海水晶调至实验盐度。养殖为期 8 周，期间定期检查盐度，适度添加水和海水晶，保证盐度稳定。实验期间未出现死亡情况。

1.2 样品采集与处理

实验期间，每 2 周进行 1 次采样。采样时，每口水泥池随机捕捞 3 尾鱼，收集肠道内容物，混合均匀为 1 个样，每次 12 个肠道内容物样品，共 48 个样品，样品记录为 S011—S934 (盐度分组+3 平行+采样次数)。样品放入液氮速冻带回实验室后 -80°C 保存待测。

1.3 DNA 提取和 16S rRNA 测序

利用 EZNA Soil DNA Kit (Omega, 美国) 试剂盒提取肠道菌群总 DNA。DNA 检测合格后，作为模版，使用通用引物 338F 和 806R，扩增 16S rRNA 基因 V3—V4 区。PCR 产物经纯化定量后，进行文库构建，使用 Illumina HiSeq2500 (Illumina, 美国) 平台测序，建库及测序在上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4 数据分析

测序序列根据两侧的接头拼接后，进行质控和过滤。按照 97% 的相似性，获得操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 代表序列，之后采用 RDP classifier 贝叶斯算法进行分类学分析，统计样品在各个分类水平的群落组成。使用 Mothur 1.30.2 与 QIIME 2020.2.0 软件分别评估肠道菌群的 α 多样性指数和 β 多样性距离矩阵。结合 PICRUST2 工具和 KEGG 基因功能谱数据库进行比对，推测肠道菌群群落功能类别的丰度信息。

实验数据以“平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$)”表示，通过 Student's t 检验比较各组间 α 多样性指数，采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 分析养殖时间和盐度对 α 多样性指数的影响差异，采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较组间的物种差异和 KEGG 功能丰度差异， $p<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 测序数据及评估

测序共获得 3 617 668 条序列，优化后序列为 3 452 259 条，平均每个样品有 71 922 条序列，序列平均长度 417 bp。稀释曲线显示，所有样品均趋近平缓 (图 1)，表明测序深度能够反映各样品肠道菌群的真实情况。

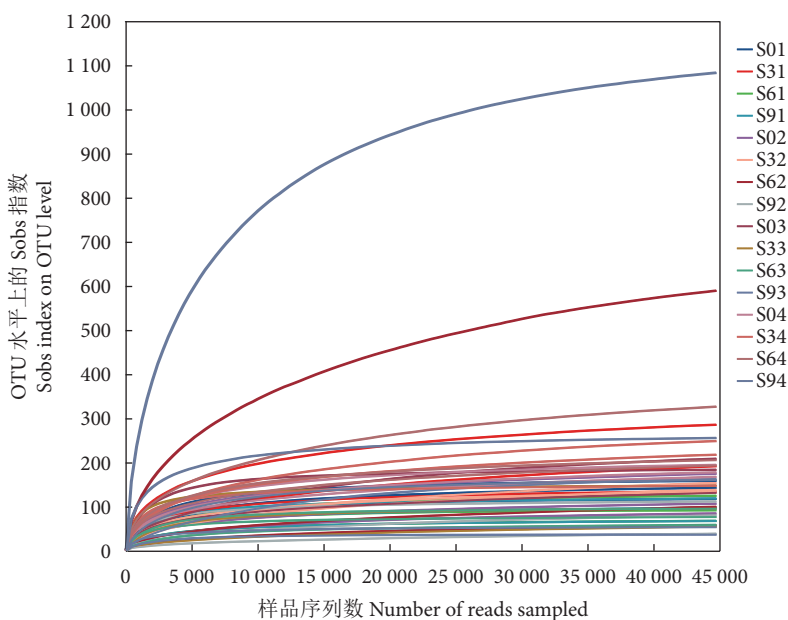


图1 物种数目饱和度稀释曲线图

注：图中样本 S01—S94 由盐度+采样次数表示。

Fig. 1 Species saturation rarefaction curves

Note: The samples are represented by salinity+sampling times.

2.2 肠道菌群多样性分析

不同样品拥有的物种数目及组间比较结果显示, 全部样品共有 2 301 个 OTUs, 其中对照组 (S0)、低盐度组 (S3)、中盐度组 (S6) 和高盐度组 (S9) 分别拥有 660、674、955 和 1 389 个 OTUs, 各组的 OTUs 数量随着盐度升高而增加 (图 2)。同时, 高盐度组 (S9) 和中盐度组 (S6) 独有的 OTUs 最多, 分别为 931 和 359 个, 可见随着盐度升高各组独有 OTUs 也随之增加。高盐度组 (S9) 和中盐度组 (S6) 共有 OTUs 为 81 个, 其余各组两两之间共有 OTUs 仅为 35~53 个。3 组之间, 对照组 (S0)、低盐度组 (S3) 和中盐度组 (S6) 共有 162 个, 其余各组 3 组之间只有 20~66 个。4 组共有 OTUs 为 179 个。

α 多样性分析结果 (表 1) 显示, Ace 和 Chao 指数随着盐度升高呈上升趋势, 表明斑点叉尾鲷肠道菌群的丰富度随着盐度增加而逐渐升高。高盐度组 (S9) 肠道菌群的丰富度最高, 但是与其他 3 组间差异不显著 ($p>0.05$)。而肠道菌群的多样性则随着盐度的增加逐步下降, 也即 Shannon 指数逐步下降, Simpson 指数逐步增加, 且对照组 (S0)

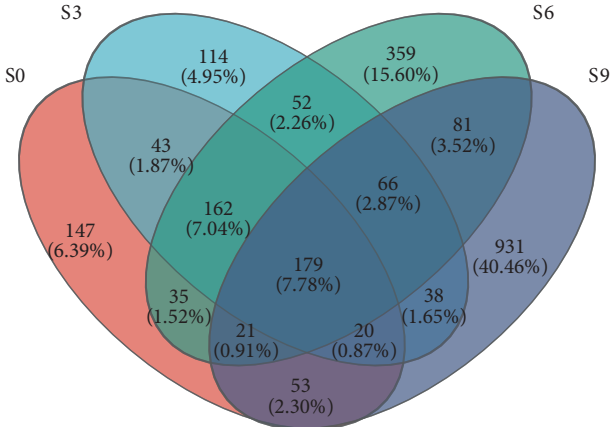


图2 不同盐度下的斑点叉尾鲷肠道微生物 OTUs
Fig. 2 Intestinal microorganisms OTUs of channel catfish at different salinity

显著高于高盐度组 ($p<0.05$)。双因素方差分析表明, 采样时间对 Ace、Chao 和 Shannon 指数有显著性影响 ($p<0.05$), 而盐度则对 Simpson 指数有显著性影响 ($p<0.05$)。进一步分析发现, 随着养殖时间的增加, Ace 和 Chao 指数逐步上升, 而 Shannon 指数逐步下降, Simpson 指数逐步上升 (附录 A 的附表 S1, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件)。

表1 斑点叉尾鲷肠道菌群多样性指数及双因素方差分析
Table 1 Diversity index and two-way ANOVA of intestinal flora of *I. punctatus*

多样性指数 Diversity index	盐度 Salinity				盐度 Salinity		采样时间 Sampling time	
	S0 (0‰)	S3 (3‰)	S6 (6‰)	S9 (9‰)	F	p	F	p
Ace	174.922±43.497	188.927±76.149	194.244±190.195	203.559±300.436	0.057 8	0.981 5	2.873 3	0.047 8
Chao	171.524±41.909	184.472±73.977	186.829±178.379	203.047±299.770	0.070 7	0.975 3	2.960 7	0.043 3
Shannon	2.129±0.524 ^A	1.922±0.712 ^{AB}	1.718±0.873 ^{AB}	1.486±1.345 ^B	1.301 2	0.287 0	3.863 1	0.016 0
Simpson	0.251±0.167 ^B	0.338±0.241 ^{AB}	0.389±0.282 ^{AB}	0.530±0.293 ^A	2.916 2	0.045 5	2.689 5	0.058 8

注: 同行数据不同上标字母表示差异显著 ($p<0.05$)。
Note: Values with different letters within the same line are significantly different ($p<0.05$).

NMDS 分析表明, 盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群样品的排列分布影响较小, 所有样品按照采样时间点明显地聚类为密集的 2 簇。其中, 所有盐度组的第一、第三次样品距离更近, 在 x 轴左侧聚为一簇, 第二、第四次样品距离更近, 在 x 轴右侧聚为一簇 (图 3)。NMDS 分析的胁强系数 (Stress) 为 0.09, 排序结果较为可靠。

2.3 肠道菌群组成比较

4 个盐度组的肠道菌群共鉴定出 39 个门, 其中, 变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门和拟杆菌门

是主要的菌门, 其余菌门相对丰度较低 (图 4)。所有盐度组的斑点叉尾鲷肠道菌群在养殖第 2 和第 6 周时均以变形菌门占据绝对优势 ($>70\%$)。而养殖第 4 和第 8 周时主要由厚壁菌门、梭杆菌门和拟杆菌门主导, 其中, 厚壁菌门一直占优 ($>60\%$), 梭杆菌门则占比下降, 拟杆菌门丰度增加。斑点叉尾鲷肠道菌群呈现出以 2 周为周期的规律性波动。但高盐度组肠道菌群养殖前 6 周波动明显, 养殖第 8 周时, 则开始维持变形菌门占优 ($>60\%$) 的状态, 蓝藻门、放线菌门和绿弯菌门明显增加。

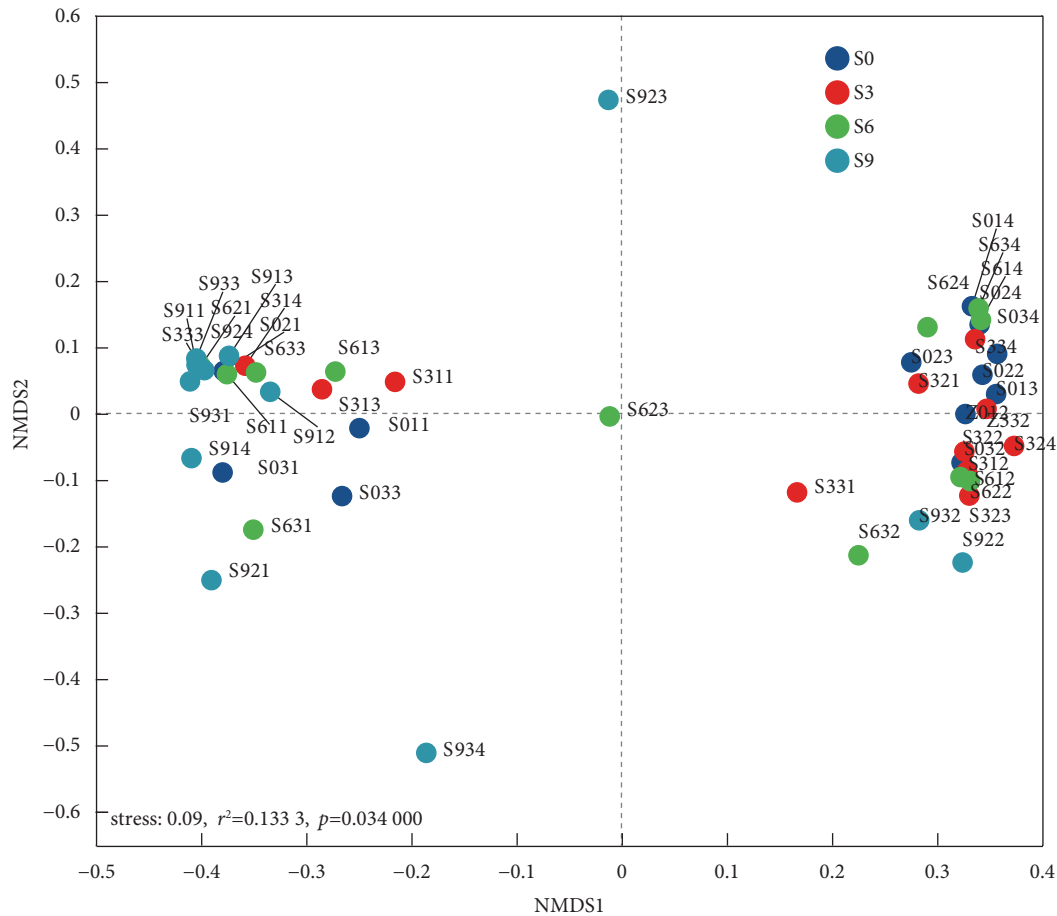


图3 不同盐度斑点叉尾鲷肠道菌群 NMDS 分析图

注：图中样本 S011—S934 由盐度+3 平行+采样次数表示。

Fig. 3 NMDS analysis of intestinal bacterial communities of *I. punctatus* at different salinity

Note: The samples are represented by salinity+3 parallel samples+sampling times.

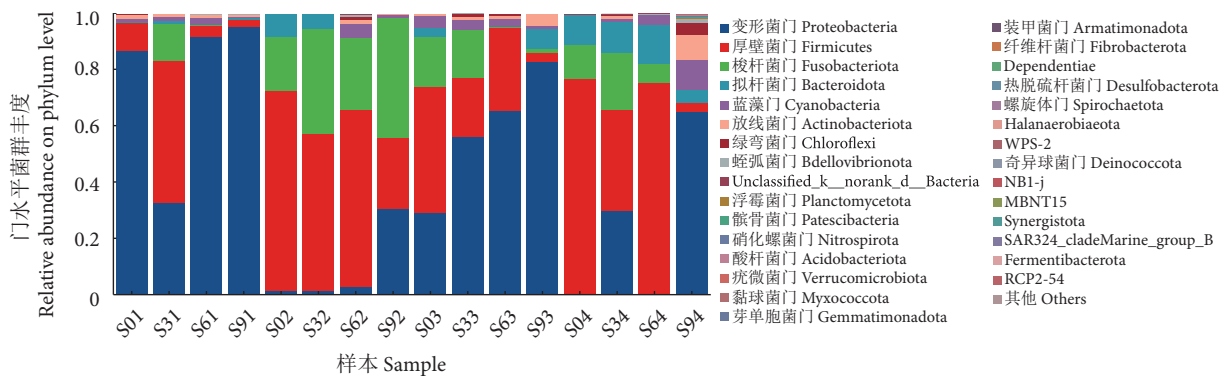


图4 不同盐度下斑点叉尾鲷肠道微生物在门水平的菌群组成

注：图中样本为同盐度每次采样数据的均值，由盐度+采样次数表示 (S01—S94)。

Fig. 4 Intestinal bacterial communities of *I. punctatus* at different salinity on phylum level

Note: The samples are the average values of the data collected each time at the same salinity, which are represented by salinity + sampling times (S01—S94).

4 个盐度组的肠道菌群共鉴定出 778 个属，无色小杆菌属 (*Achromobacter*)、鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、苏黎世杆

菌属 (*Turicibacter*) 是主要菌属。与门水平相似，同等盐度条件下，斑点叉尾鲷肠道菌群在属水平也呈现出以 2 周为周期的规律性波动。养殖第 2 和第 6 周时均以无色小杆菌属占据绝对优势。而养殖

第4和第8周时由鲸杆菌属、梭状芽孢杆菌属、罗姆布茨菌属和苏黎世杆菌属组成, 其中, 鲸杆菌属、罗姆布茨菌属和苏黎世杆菌属丰度逐步降低, 梭状芽孢杆菌属占比增加。高盐度组 (S9) 肠道菌群养殖前6周波动明显, 养殖第8周时, 继续维持无色小杆菌属占优的状态。同时, 高盐度下, 肠道

菌群中葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 等致病菌含量也有所增加。属水平样品聚类结果与NMDS分析一致, 所有样品按采样周期聚类为两簇, 养殖第2和第6周样品和养殖第8周高盐度组聚为一簇, 剩下的养殖第4和第8周样品聚为另一簇 (图5)。

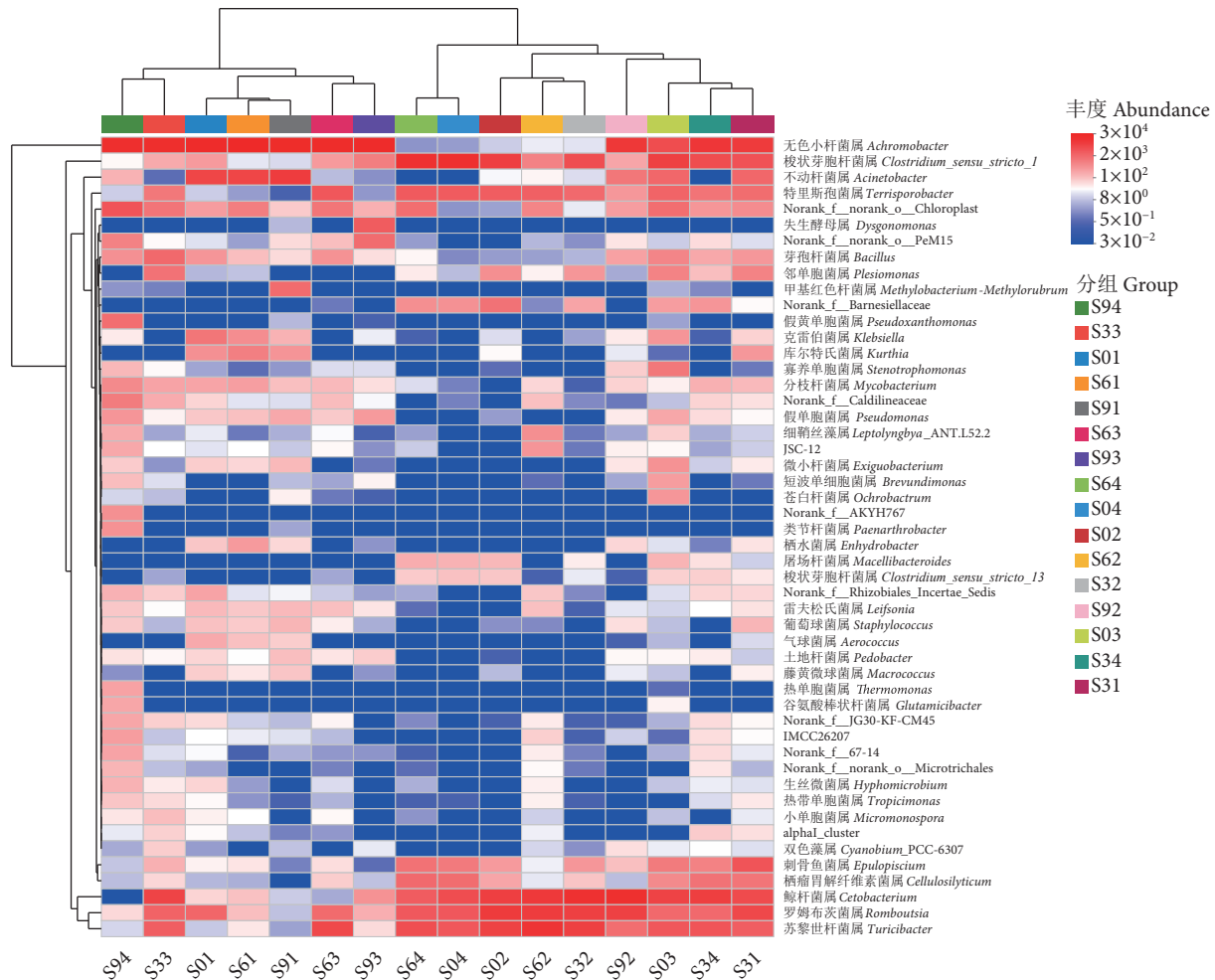


图5 不同盐度下斑点叉尾鲷肠道微生物在属水平的菌群组成

注: 图中样本为同盐度每次采样数据的均值, 由盐度+采样次数表示 (S01—S94)。

Fig. 5 Intestinal bacterial communities of *I. punctatus* at different salinity on genus level

Note: The samples are the average values of the data collected each time at the same salinity, which are represented by salinity+sampling times (S01—S94).

2.4 肠道差异分析

ADOSIM 检验表明 4 个盐度组间肠道菌群组成存在显著性差异 ($r^2=0.588$, $p=0.001$)。门水平组间差异性分析表明 (图 6-a), 主要差异均集中于高盐度组和对照组间, 其中, 对照组的厚壁菌门相对丰度极显著高于高盐度组 ($p<0.01$), 高盐度组的变形菌门、蛭弧菌门和纤维杆菌门相对丰度显著高于对照组 ($p<0.05$)。而梭杆菌门则是低盐度组相对丰度最高的, 显著高于其他组别 ($p<0.05$)。按照养殖

时间分析, 差异也集中于高盐度组和对照组, 养殖第2周时, 高盐度组的变形菌门显著高于其他组 (附录 B 的附图 1, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件); 养殖第4周, 对照组的厚壁菌门和拟杆菌门显著高于高盐度组 (附录 B 的附图 2, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件); 养殖第8周, 高盐度组变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、蛭弧菌门和纤维杆菌门的丰度均显著高于其他组 (附录 B 的附图 3, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件)。

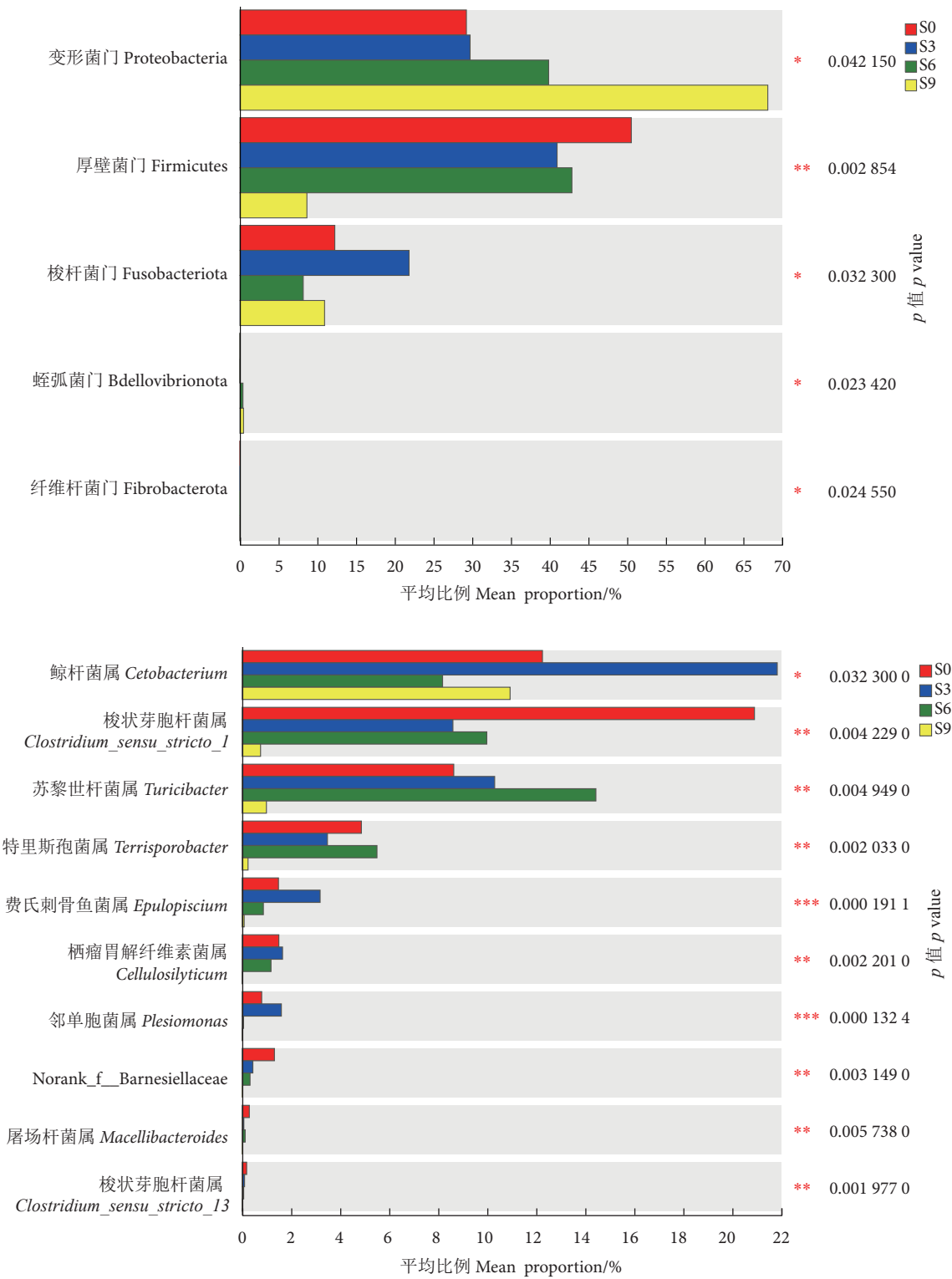


图6 不同盐度下斑点叉尾鲷肠道微生物在门和属水平组间的显著性差异

注: *. $p<0.05$; **. $p<0.01$; ***. $p<0.001$ 。

Fig. 6 Significance of intestinal bacterial communities on phylum and genus levels

Note: *. $p<0.05$; **. $p<0.01$; ***. $p<0.001$.

doi.org/10.12131/20250003 的资源附件)。而养殖第6周末发现组间的菌门丰度有显著性差异。

属水平的差异比较结果显示,主要差异均集中于高盐度组和其他盐度组间,且均是高盐度组的菌

属相对丰度显著降低(图6-b)。其中,对照组的梭状芽胞杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)、Norank_f_Barnesiellaceae、屠场杆菌属(*Macellibacteroides*)和梭状芽胞杆菌属(*Clostridium_sensu_*

stricto_13) 占优; 低盐度组鲸杆菌属、刺骨鱼菌属 (*Epulopiscium*)、栖瘤胃解纤维素菌属 (*Cellulosilyticum*) 和邻单胞菌属 (*Plesiomonas*) 占优; 中盐度组苏黎世杆菌属和特里斯孢菌属 (*Terrisporobacter*) 占优。按照养殖时间分析, 养殖第 2 周时, 低盐度组罗姆布茨菌属、鲸杆菌属、刺骨鱼菌属、栖瘤胃解纤维素菌属、邻单胞菌属和梭状芽胞杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_13*) 丰度显著高于其他组 (附录 B 的附图 4, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件); 养殖第 4 周时, 对照组中梭状芽胞杆菌属 (*Clostridium_sensu_*

stricto_1)、邻单胞菌属、屠场杆菌属和梭状芽胞杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_13*) 占优, 中盐度组苏黎世杆菌属占优, 高盐度组分枝杆菌属 (*Myobacterium*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、双色藻属 (*Cyanobium_PCC-6307*) 和微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 显著占优 (附录 B 的附图 5, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件); 养殖第 6 周时, 仅对照组的刺骨鱼菌属显著占优 (附录 B 的附图 6, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件); 养殖第 8 周时, 与第 4 周结果类似, 对照组的梭状芽胞杆菌属

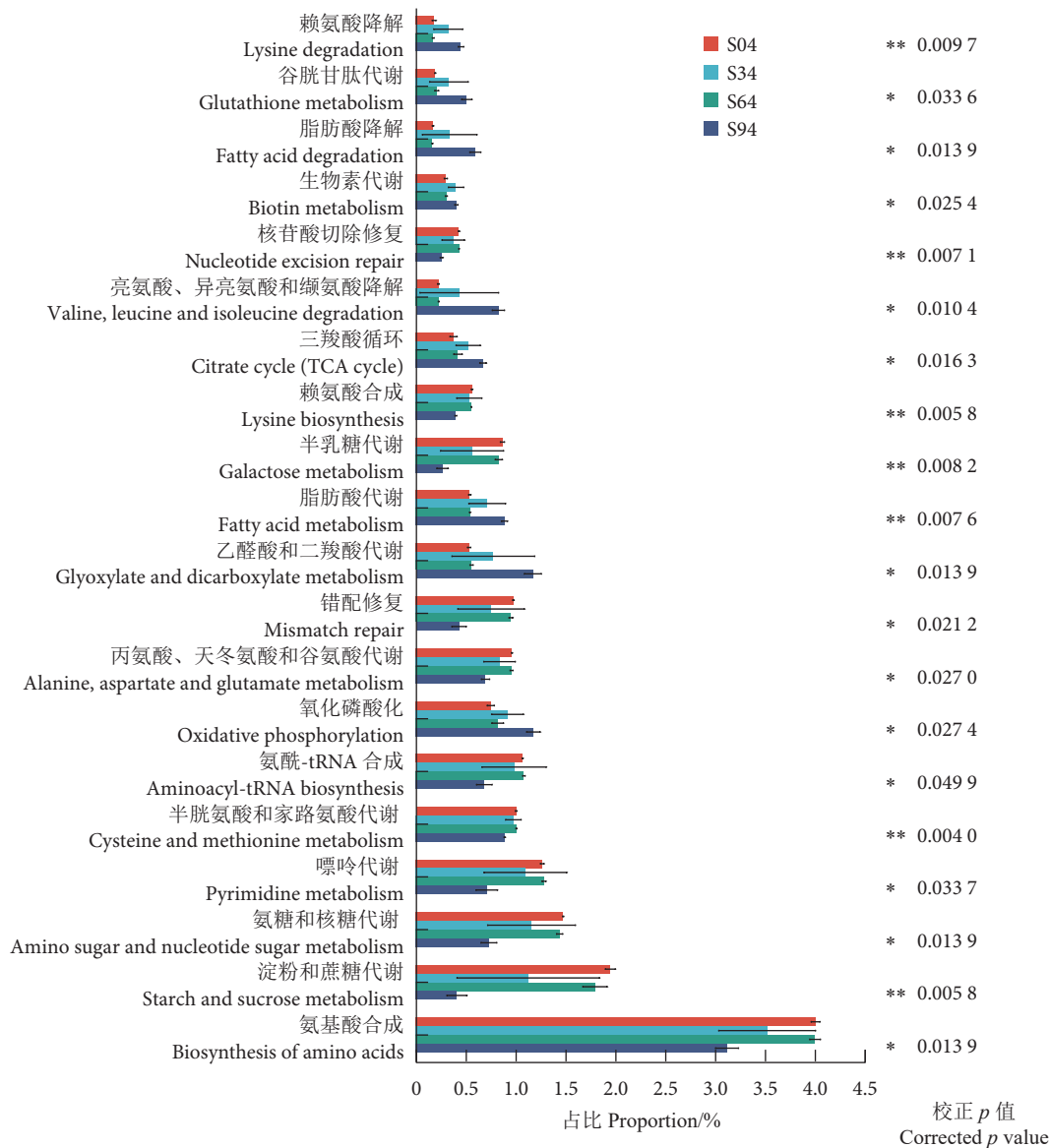


图7 不同盐度下养殖 8 周斑点叉尾鲷肠道菌群主要功能丰度对比

注: *. $p < 0.05$; **. $p < 0.01$. 图中样本由盐度+采样次数表示。

Fig. 7 KEGG functions in intestinal bacterial communities of *I. punctatus* after 8-week culture at different salinity

Note: *. $p < 0.05$; **. $p < 0.01$. The samples are represented by salinity+sampling times.

(*Clostridium_sensu_stricto_1*) 和中盐度组的苏黎世杆菌属占优, 但是高盐度组开始在多个菌属中占据显著优势(附录 B 的附图 7, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件)。

2.5 肠道菌群功能预测

肠道菌群功能预测共获得 391 个 KEGG 数据库代谢通路 level 3 水平的功能信息。单因素方差分析筛选不同养殖时间点盐度组间丰度差异显著的基因功能, 检验校正后, 养殖第 2—第 6 周各盐度组肠道菌群功能相近, 无显著性差异, 而在养殖第 8 周, 肠道菌群功能呈显著差别(附录 A 的附表 S2—S5, 详见 <http://dx.doi.org/10.12131/20250003> 的资源附件)。丰度最高的前 20 基因功能主要集中于新陈代谢和遗传信息处理, 且全部显著差异的功能均存在于对照组(S0)和高盐度组(S9)之间(图 7)。其中, 对照组在氨基酸合成与代谢、淀粉、蔗糖、氨糖、核糖、半乳糖和嘌呤等物质代谢、核苷酸错配、切除和修复等方面的功能丰度显著高于高盐度组($p<0.05$), 而高盐度组则主要在脂肪酸代谢和降解、维生素和氨基酸降解、三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢及氧化磷酸化能量代谢等方面功能丰度显著高于对照组($p<0.05$)。

3 讨论

3.1 盐度对斑点叉尾鲟肠道菌群多样性的影响

盐度是支配水域生态系统的主要环境因子, 相比于其他理化因子, 其对环境微生物群落的影响力更加突出^[10]。大量研究也表明, 盐度与水体中包括鱼类在内的水生动物肠道菌群稳态之间存在着紧密联系^[23]。本研究中, 不同盐度条件下, 斑点叉尾鲟肠道菌群的丰富度和多样性产生了不同的变化。随着盐度的升高, 肠道菌群的 OTUs 数量和丰富度也逐步增加, 多样性则显著下降。该结果与青海湖裸鲤、弓背青鲮、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*) 等不同养殖动物的盐度胁迫结果一致^[13-14,24-25]。随着盐度的升高, 鱼体代谢速率增大, 会消耗更多的能量来维持身体平衡^[26], 因此, 肠道的 α -淀粉酶和脂肪酶活性显著增加, 以促进对淀粉类物质和脂肪的消化吸收^[27]。高盐度条件下鱼体对能量和营养物质需求的增加, 迫使肠道菌群中具有相关功能的耐盐菌的种类和丰度相应地增加, 以补偿宿主更加旺盛的代谢过程^[28]。同

时, 随着养殖时间的延长, 盐度对肠道菌群多样性的影响逐步增强。在养殖末期, 肠道菌群的丰度均有所增加, 但这种增加呈现不同程度的变化。其中, 耐盐菌种和与能量代谢相关的菌种数量逐渐上升, 而不耐盐的菌种则受到大量抑制, 这导致肠道菌群的整体多样性降低。

3.2 盐度对斑点叉尾鲟肠道菌群组成的影响

有研究表明, 斑点叉尾鲟肠道菌群以厚壁菌门、拟杆菌门和梭杆菌门为主^[29-30]。本研究中, 肠道菌群以变形菌门、厚壁菌门和梭杆菌门为主, 且变形菌门占优势(>70%)。主要菌门的差别可能与养殖环境差异有关。先前在相同环境的水泥池中养殖的斑点叉尾鲟, 其肠道菌群中变形菌门是优势菌门^[17], 且在多种鱼类肠道菌群中, 变形菌门也通常是优势菌群^[31]。过去盐度胁迫对水生动物肠道菌群影响的研究, 采样时间均相对单一, 通常只开展胁迫结束时肠道菌群组成与多样性分析, 或者进行胁迫前后的比较分析, 更多地是呈现盐度胁迫的结果。而本研究以 2 周为周期, 多次采样, 完整展示了盐度胁迫下斑点叉尾鲟肠道菌群的动态变化过程, 养殖第 8 周, 高盐度组在越来越多的门和属分类单位上占据优势。淡水和中低盐度肠道菌群呈现出规律的变形菌门与厚壁菌门、梭杆菌门、拟杆菌门间周期变动。厚壁菌门能够分解纤维素, 产生挥发性脂肪酸, 提高宿主的营养利用率^[17]。拟杆菌门和梭杆菌门与糖类代谢紧密相关, 能够高效分解代谢低碳物质和碳水化合物, 为宿主提供能量^[17,32]。而高盐度停止了斑点叉尾鲟肠道菌群的变化节律, 变形菌门从第 6 周后就持续维持显著优势。变形菌门在多种鱼类的高盐度胁迫中均被发现丰度增加^[13-14,31-32]。高盐度下, 鱼类代谢旺盛, 变形菌门丰度增加以合成代谢更多的脂多糖, 但是脂多糖会破坏肠壁屏障, 导致鱼类肠道炎症^[33]。属水平上, 高盐度胁迫导致鲸杆菌属、梭状芽孢杆菌属、苏黎世杆菌属、栖瘤胃解纤维素菌属等主要的益生菌属水平显著下降。尤其丰度最高的鲸杆菌属, 可以合成维生素 B₁₂, 分解代谢糖脂物质, 提高宿主抗氧化和抗病原感染能力^[13]。这些益生菌属的显著下降是高盐度胁迫影响鱼类代谢和免疫功能、导致生长性能下降和死亡率增加的主要原因。

3.3 盐度对斑点叉尾鲟肠道菌群功能的影响

通过 PICRUSt 2 软件对不同盐度组斑点叉尾鲟

肠道菌群功能预测发现,与肠道菌群组成对盐度的迅速响应相比,肠道菌群功能的显著性差异直到第8周才开始显现,且主要存在于高盐度组与对照组之间。高盐度组在脂肪酸代谢与降解、维生素和氨基酸降解等方面的功能丰度显著升高,尤其是与三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢以及氧化磷酸化能量代谢相关功能的丰度也显著增加。该结论与其他鱼类的盐度胁迫结果一致,表明盐度显著改变了肠道菌群的组成,并影响了其介导的功能。在高盐度条件下,鱼类生长减缓,代谢加快,机体进入应激状态,消耗更多的物质和能量。与此同时,鱼体的多种抗氧化酶和免疫酶活性下降,导致氧化损伤增加、非特异性免疫力降低,以及核苷酸错配、切除和修复等遗传修复功能显著减弱^[26]。由此可见,9‰的高盐度已对斑点叉尾鲷产生了较强的胁迫作用,导致其新陈代谢和免疫修复等功能发生了相应变化。深远海驯化养殖试验表明,饲料中添加3.45%的精氨酸及 γ -氨基丁酸,可以提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的渗透调节能力,促进机体的抗氧化能力和免疫力,有效缓解虹鳟的海水应激反应^[34]。有研究表明,饲料中添加适量的盐,可以提高不同鱼类肠道的碱性磷酸酶、乳糖酶活性,进而有效降低高盐胁迫导致的鱼体氧化损伤,在生理上更好地适应海水养殖环境^[35-37]。因此,建议后续开展盐碱地斑点叉尾鲷养殖的池塘盐度应低于9‰。同时,在日常投喂过程中提高饲料能量物质,并相应补充精氨酸、 γ -氨基丁酸以及梭杆菌、拟杆菌等益生菌群,帮助提高肠道菌群的多样性和功能,减少盐碱地养殖斑点叉尾鲷的应激,提高养殖效率和产出,促进盐碱水域的综合利用。

4 结论

本研究利用16S rRNA测序技术研究了盐度对斑点叉尾鲷肠道菌群组成和功能的影响。结果表明,对照组和中、低盐度组下,斑点叉尾鲷肠道菌群呈现出节律性的变化,而高盐度胁迫则打乱了肠道菌群的变化节律,维持变形菌门占优的状态。随着盐度的升高,斑点叉尾鲷肠道菌群丰富度上升,但多样性显著下降。高盐度胁迫时,肠道菌群功能也发生了显著变化,脂肪酸代谢和降解、维生素和氨基酸降解、能量代谢等方面功能丰度显著升高,核苷酸错配、切除和修复等遗传修复功能显著

下降。高盐度造成了鱼体的强烈应激,提高了能量消耗,最终改变了肠道菌群的组成和功能。因此,今后盐碱地开展斑点叉尾鲷养殖时,建议加强管理,提高饲料能量物质,补充益生菌群。

参考文献:

- [1] ROBINSON E H, LI M H. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, nutrition in the United States: a historical perspective[J]. J World Aquac Soc, 2020, 50(1): 93-118.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2024年中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2024: 25.
- [3] ZHONG L Q, SONG C, CHEN X H, et al. Channel catfish in China: historical aspects, current status, and problems[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 367-373.
- [4] 钟立强,王明华,陈校辉,等. 江苏斑点叉尾鲷产业现状及发展战略思考[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(17): 137-143.
- [5] 段永强,张世勇,王明华,等. 斑点叉尾鲷苗对盐度的急性耐受力及行为反应研究[J]. *水产科学*, 2023, 42(6): 1047-1053.
- [6] ZHOU L Y, WANG M H, ZHANG S Y, et al. Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in sediment of brackish channel catfish ponds in Eastern China[J]. *Aquaculture*, 2024, 578: 740105.
- [7] IMSLAND A K, GSTAVSSON A, GUNNARSSON S, et al. Effects of reduced salinities on growth, feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*[J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 254-259.
- [8] 强俊,任洪涛,徐跑,等. 温度与盐度对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化酶活力的协同影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(1): 255-263.
- [9] MO Y Y, PENG F, GAO X F, et al. Low shifts in salinity determined assembly processes and network stability of microeukaryotic plankton communities in a subtropical urban reservoir[J]. *Microbiome*, 2021, 9: 128.
- [10] LIU C Q, WU F, JIANG X Y, et al. Salinity is a key determinant for the microeukaryotic community in lake ecosystems of the Inner Mongolia Plateau, China[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 841686.
- [11] SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota-masters of host development and physiology[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 227-238.
- [12] MAYER E A, NACE K, CHEN S. The gut-brain axis[J]. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 439-453.
- [13] 赵子丰,金文杰,赵静,等. 青海湖裸鲤肠道菌群对不同盐度胁迫的响应[J]. *大连海洋大学学报*, 2024, 39(2): 225-233.
- [14] 黄健旋,刘悦,黎学友,等. 盐度对弓背青鲮行为及肠道菌群的影响[J]. *农业与技术*, 2024, 44(13): 114-120.
- [15] OLAFSEN J A, HANSEN G H. Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae[J]. *J of Fish Bio*, 1992, 40(2): 141-156.

- [16] 季英杰. 发酵有机肥对草鱼池塘水环境及草鱼肠道菌群的影响评价[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017: 45-46.
- [17] 徐静雯, 钟立强, 张世勇, 等. 施肥对斑点叉尾鲷肠道菌群的影响[J]. 南方水产科学, 2024, 20(4): 116-123.
- [18] ABASS N Y, ALSAQUFI A S, MAKUBU N. Genotype-environment interactions for growth and survival of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*Ictalurus furcatus*), and channel catfish, *I. punctatus*, ♀×blue catfish, *I. furcatus*, ♂ hybrid fry at varying levels of sodium chloride[J]. Aquaculture, 2017, 471: 28-36.
- [19] 张世勇, 邵俊杰, 陈校辉, 等. 盐度对斑点叉尾幼鱼生长性能、肌肉持水力和营养组成的影响[J]. 生物学杂志, 2018, 35(3): 57-61.
- [20] 钟立强, 周丽颖, 张世勇, 等. 养殖池塘水体异味物质土臭素与环境因子关系解析[J]. 中国农学通报, 2024, 40(27): 159-164.
- [21] ZHANG S Y, DUAN Y Q, ZHONG L Q, et al. Using comparative transcriptome analysis to identify molecular response mechanisms to salinity stress in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Environ Pollut, 2023, 333: 121911.
- [22] TANG L Y, DUAN Y Q, XIE B J, et al. Effects of salinity stress on the growth performance, histological characteristics, and expression of genes related to apoptosis and immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. J Fish Biol, 2024, <https://doi.org/10.1111/jfb.16029>
- [23] SUN F L, WANG C Z, CHEN X L. Bacterial community in *Sinonovacula constricta* intestine and its relationship with culture environment[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106: 5211-5220.
- [24] 张紫娟, 戴文芳, 薛清刚, 等. 急性盐度胁迫对缢蛏肠道菌群结构及功能的影响[J]. 海洋学报, 2023, 45(11): 131-141.
- [25] 符振强, 董扬帆, 汤上上, 等. 低盐胁迫下饲料中添加 α -硫辛酸对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力及肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(9): 5203-5218.
- [26] 王海亮, 温海深, 张晓燕. 盐度胁迫对花鲈幼鱼肠道抗氧化和非特异性免疫能力的影响[J]. 现代农业科技, 2016(4): 261-269.
- [27] 温久福, 蓝军南, 周慧, 等. 盐度对花鲈幼鱼消化系统和抗氧化系统的影响[J]. 动物学杂志, 2019, 54(5): 719-726.
- [28] LIU D R, ZHANG Z W, SONG Y K, et al. Effects of salinity on growth, physiology, biochemistry and gut microbiota of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Aquat Toxicol, 2023, 258: 106482.
- [29] 熊向英, 赵艳飞, 王志成. 斑点叉尾鲷肠道及其养殖环境菌群结构分析[J]. 水产科学, 2022, 41(4): 589-596.
- [30] LARSEN A M, MOHAMMED H H, ARIAS C R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(6): 1396-1404.
- [31] 田璐. 盐度对黄姑鱼生存生长、非特异性免疫及肠道菌群的影响[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019: 39.
- [32] 黎烽. 盐度对草鱼肉质和肠道菌群的影响研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2022: 35.
- [33] BUIJS Y, BECH P K, VAZQUE-ALBACETE D, et al. Marine Proteobacteria as a source of natural products: advances in molecular tools and strategies[J]. Nat Prod Rep, 2019, 36(9): 1333-1350.
- [34] 孙云霞, 周演根, 周思岐, 等. 饲料精氨酸含量对海水驯化虹鳟的渗透调节、抗氧化和免疫力的影响[J]. 水生生物学报, 2024, 48(9): 1459-1472.
- [35] SHEENAN H, YANIV H, TATIYANA S, et al. Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity[J]. Aquaculture, 2004, 248: 315-324.
- [36] MAGNE S, BENGT F. The effects of dietary NaCl supplement on hypo-osmoregulatory ability and sea water performance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) smolts[J]. Aquac Res, 2000, 31(10): 737-743.
- [37] SHIAU S Y, LU L S. Dietary sodium requirement determined for juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) reared in fresh water and seawater[J]. Brit J Nut, 2004, 91(4): 585-590.