

中华绒螯蟹肝胰腺“白化”症体组织及池塘水体、底泥微生物多样性分析

刘训猛¹, 张悦², 方苹¹, 陈静¹, 吴亚锋¹, 陈辉¹

(1. 江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210036; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 研究肝胰腺“白化”河蟹样品, 利用高通量测序技术对发病池塘水体、底泥及发病前后组织样品中微生物多样性进行分析, 基于该批次样品分析, 蟹体发病前后鳃、肝胰腺和肠道组织的菌群丰度和多样性成反比例关系。外来菌群对蟹体的侵染过程首先在鳃组织, 其后为肝胰腺, 最后为肠道。发病河蟹肝胰腺柔膜菌纲的菌群占比, 较健康个体急剧上升。

关键词: 河蟹; 肝胰腺; 微生物多样性; 高通量测序; 菌群丰度

中图分类号: S947

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2019)03-0078-06

“Whitening” Disease of Hepatopancreas of *Eriocheir sinensis*: Microbial Diversity Analysis of Tissue, Pond Water and Sediment

LIU Xun-meng¹, ZHANG Yue², FANG Ping¹, CHEN Jing¹, WU Ya-feng¹, CHEN Hui¹

(1. Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Nanjing 210036, China;

2. Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To study the changes of microorganisms in various tissues, pond water and sediment in a case of hepatopancreas “whitening” *Eriocheir sinensis* samples were researched. The high-throughput sequencing technology was used to analyze the microbial diversity in pond water, sediment and tissue samples before and after onset. According to the results, the abundance and diversity of sputum, hepatopancreas and intestinal tissues of crabs were inversely proportional before and after the onset. The process of infection of the crab by the foreign flora was as follows: firstly in the sputum tissue, then by the hepatopancreas, and finally in the intestine. Compared with healthy crabs, the proportion of the flora in Mollicutes of the hepatopancreas “whitening” samples had increased sharply.

Key words: *Eriocheir sinensis*; hepatopancreas; microbial diversity; high-throughput sequencing; micro flora abundance

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹,是我国特有的名特优水产品。随着长期集约化、高密度、单品种养殖,以及种质退化、水环境承载力下降等诸多因素的作用,河蟹病害的发生率不断增加。江苏河蟹产量占全国总产量的一半左右,近年来河蟹养殖产业也受到各类病害的不断侵袭,诸如腹水病、弧菌病、白斑综合征、河蟹颤抖病、“水瘪子”病等^[1],严重制约着河蟹产业的发展,其中“水瘪子”病的发生尤为严

收稿日期: 2019-03-14

基金项目: 江苏省河蟹产业技术体系项目资金(JFRS01);江苏省渔业科技类项目(D2017-4)

作者简介: 刘训猛(1983—),男,江苏新沂人,高级工程师,硕士,主要从事水生动物病害研究。

重。河蟹“水瘪子”病为养殖户的俗称,原农业部将其命名为“河蟹肝胰腺病变综合征”。该病2007年在江浙地区就偶有发生^[2],2015年在江苏兴化地区大面积暴发^[3]。主要症状为肝胰腺萎缩,呈灰黄色、灰白色或者白色。微生物16S rDNA扩增子序列包括保守区域和高变区域,保守区在微生物菌种间差异不大,高变区具有属或种的特异性,随亲缘关系不同而有一定的差异^[4]。近年来,随着 Paired-end Reads^[5] 拼接技术快速发展,使得16S rDNA扩增子测序技术分析准确性得到进一步提升,已成为研究环境和组织样本中微生物群落组成的重要手段。本研究应用该方法对采集样品进行微生物菌群高通量测序,旨在通过对发病池塘水体、底泥以及池塘内出现肝胰腺“白化”(下称发病)和未出现肝胰腺“白化”(下称正常)蟹的体鳃、肝胰腺和肠道微生物菌群的变化情况进行对比分析,以期了解发病前后蟹体内以及蟹体与水体和底泥微生物菌群的变化关系,为此类河蟹病害研究工作提供基础数据资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2017年5月江苏武进某养殖户塘口部分河蟹出现肝胰腺“白化”症状,作者进行了采样。水样、底泥和河蟹采于同一发病塘口。

1.2 试验方法

1.2.1 样本采集 水样采集:在池塘不同位置选择3个点,每个点采集水样200~500 mL,用500 mL塑料瓶装好。每个点取200 mL水样混匀后,静置30 min,用0.22 μm 滤膜过滤后,将滤膜置于无菌50 mL离心管中,−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

泥样采集:在池塘不同位置选择3个点,每点采集底泥150~200 g,尽量采集表层1 cm左右的,每个底泥采集的深度要一致,装在无菌塑封袋中密封好。各个点底泥称取150 g混匀后,加入500 mL无菌双蒸水搅拌漂洗1 min,静置10 min,水样用0.22 μm 滤膜过滤后,滤膜置于无菌50 mL离心管中,−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

河蟹样品采集:体表70%酒精擦拭后,无菌采集河蟹的鳃、肝胰腺、肠道(去除内容物,用PBS冲洗),将肝胰腺“白化”和健康样本分开处理,分别放入2 mL冻存管中,每组设置3个重复组后混匀,−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 DNA提取、PCR扩增及高通量测序 样本高通量测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。具体步骤如下:采用CTAB方法提取样本的基因组DNA,以稀释后的基因组DNA为模板($1\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),使用Taq DNA Polymerase进行PCR,PCR引物为通用引物。对应扩增区域为16S rDNA V3~V4区^[6]。PCR产物使用GeneJET胶回收试剂盒(Thermofisher)回收,文库构建采用Ion Plus Fragment Library Kit试剂盒构建文库,经Qubit定量和文库检测合格后,进行Illumina MiSeq测序(Ion S5TMXL, Thermofisher)^[7]。然后对所有样品的全部序列进行聚类成OTU。

1.2.3 数据分析 本试验对Illumina Miseq测序数据进行分析,分析内容包括测序深度^[8]、OTU聚类分析统计、OTU的heatmap图、物种差异分析及PCoA等分析^[9]。

2 结果与分析

2.1 样品采集

采样池塘水草生长状况良好,因强对流天气连续暴雨致水体浑浊,共采集河蟹30只,约 $50\text{ g} \cdot \text{只}^{-1}$ 。正常河蟹21只(70%),肝胰腺“白化”的7只(23%),肝胰腺糜烂、消失的2只(7%)。解剖可见正常河蟹肝胰腺完整,呈黄色(图1A)。病程早期可见河蟹鳃部组织完好,腹腔有少量积液或无积液,壳硬,肌肉组织无异状,肝胰腺形状完整,呈一条条丝线状,颜色为灰白色(图1B)。病程后期河蟹鳃部组织结构完整,缺少弹性,腹腔有少量积液,壳硬,肌肉组织无异状,肝胰腺完全消失或糜烂、无完整形态,颜色呈米白色或黑褐色(图1C)。

采集池塘水样实验室处理后编号为SS-50-1;泥样编号为N-50-1;发病河蟹鳃组织编号为S-50-1;正

常河蟹鳃组织编号为 S-50-2;发病河蟹肝胰腺组织编号为 G-50-1;正常河蟹肝胰腺组织编号为 G-50-2;发病河蟹肠道组织编号为 C-50-1;正常河蟹肠道组织编号为 C-50-2。

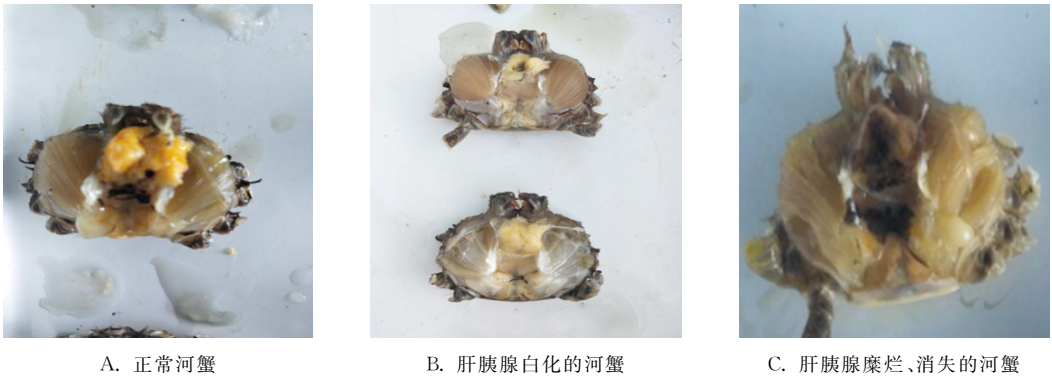


图 1 河蟹肝胰腺正常和发病对比

2.2 微生物菌群多样性分析

表 1 显示,所有样品测序深度值均超过 0.99,说明本次测序结果对各样本文库覆盖率非常高,各样本中序列没有被测出的概率较低。微生物菌群丰度指数结果:ACE 指数为水样(129.86) > 泥样(89.78) > 肠道(74.95/84.75) > 鳃(69.47/67.72) > 肝胰腺(66.27/47.39)。Chao1 指数为水样(139) > 泥样(88) > 肠道(72.6/79.86) > 鳃(73/63.67) > 肝胰腺(63/44.2)(表 1)。微生物菌群多样性 Shannon 指数为泥样(4.85) > 水样(4.475) > 肠道(3.864/3.399) > 鳃(3.509/3.732) > 肝胰腺(2.273/2.709)(表 1)。

表 1 测序效果和多样性指数

样本序号	测序深度	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数
SS-50-1	0.999	129.86	139	4.475
N-50-1	1	89.78	88	4.85
S-50-1	0.999	69.47	73	3.509
S-50-2	1	67.72	63.67	3.732
G-50-1	0.999	66.27	63	2.273
G-50-2	0.999	47.39	44.2	2.709
C-50-1	1	74.95	72.6	3.864
C-50-2	0.999	84.75	79.86	3.399

不同分类水平下菌群数量统计结果如表 2 所示。所有样本在界的分类水平下分类数均为 1 个,从门的分类水平开始,各个样品间菌群构成数量开始出现分化。在属的分类水平下出现明显差异,种类数对比水样(57) > 泥样(47) > 肠道(40/44) > 鳃(38/37) > 肝胰腺(36/28)。在门、纲和目的分类水平下泥样 > 水样 > 鳃 > 肠道 > 肝胰腺。正常河蟹组织和发病河蟹组织对比肝胰腺 > 肠道 > 鳃,发病后肝胰腺和鳃菌群种类数增多,肠道菌群种类数减少,肝胰腺变化幅度最大,肠道和鳃变化幅度较少(表 2)。

表 2 不同分类水平下微生物种类数

样本序号	界	门	纲	目	科	属
SS-50-1	1	9	15	33	47	57
N-50-1	1	10	20	38	44	47
S-50-1	1	7	9	21	28	38
S-50-2	1	6	10	19	27	37
G-50-1	1	6	10	20	27	36
G-50-2	1	5	6	12	17	28
C-50-1	1	6	9	16	24	40
C-50-2	1	6	9	21	29	44

(Un)weighted unifracs 距离矩阵热图分析各样品间菌群多样性差异结果:发病与健康河蟹菌群差异系数鳃为 0.2~0.3,肝胰腺为 0.5~0.6,肠道为 0.1~0.2。河蟹组织与水样和泥样差异系数均在 0.6 以上。水样和泥样与组织间差异系数>肝胰腺间(发病与正常)>鳃间(发病与正常)>肠道间(发病与正常)(图 2)。

图 3 为 TOP30 属水平微生物的差异结果。水样和底泥两个样本点重合度超过 50%,表明两样本间微生物群落的相似度非常高。水样和底泥两个样本与河蟹鳃、肝胰腺和肠道组织的距离都相对较远,表明其与河蟹组织的微生物群落相似度低。鳃(发病与正常)两样品间微生物菌群相似度相对肝胰腺(发病与正常)和肠道(发病与正常)较低,鳃(发病与正常)>肝胰腺(发病与正常)>肠道(发病与正常)。

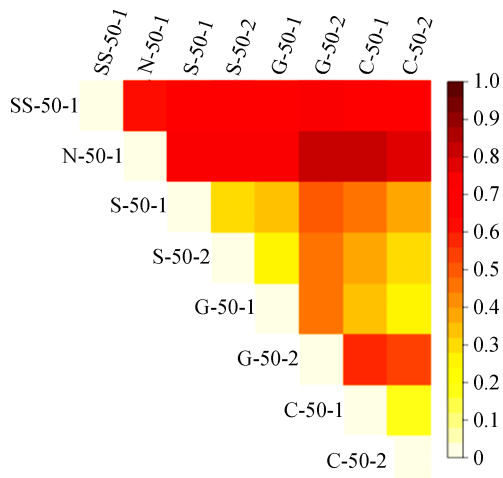


图 2 (Un)weighted unifracs 距离矩阵热图

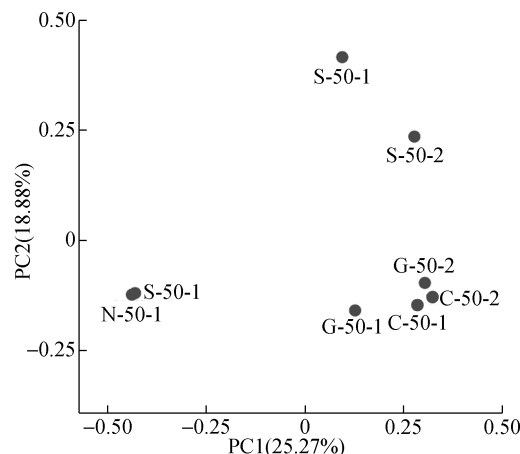


图 3 TOP30 属水平微生物差异 PCoA 图

2.3 微生物菌群组成分析

基于门分类水平菌群相对丰度对比结果,水样中优势菌群为放线菌门(Actinobacteria 54.1%)、变形菌门(Proteobacteria 23.75%)、拟杆菌门(Bacteroidetes 20.34%)、疣微菌门(Verrucomicrobia 1.46%)等。泥样中优势菌群为变形菌门(39.14%)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae 23.12%)、绿弯菌门(Chlorobacter 14.51%)、酸杆菌门(Acidobacteria 13.61%)、放线菌门(4.3%)、硝化螺旋菌门(4.16%)等(图 4)。

发病与健康河蟹鳃部微生物群落中,变形菌门丰度水平明显下降,厚壁菌门(Firmicutes)丰度水平基本持平,拟杆菌门丰度水平明显上升。肝胰腺发病与健康对比,变形菌门丰度水平明显下降,厚壁菌门丰度水平基本持平,无壁菌门(Tenericutes)丰度水平明显上升,且占比较高。肠道发病与健康对比,变形菌门丰度水平明显下降,厚壁菌门、拟杆菌门丰度水平基本持平,无壁菌门丰度水平明显上升。养殖池塘、底泥和河蟹体所共有且占比较高优势菌群为变形菌门。河蟹体鳃、肝胰腺和肠道所共有且占比较高的优势菌群为厚壁菌门。发病河蟹与健康河蟹对比鳃、肝胰腺和肠道的变形菌门丰度水平明显下降,厚壁菌门丰度水平基本持平。肝胰腺和肠道无壁菌门丰度水平明显上升,且占比较高,在总菌群中丰度占比约 50%(图 4)。

各样品丰度最高的 3 个优势菌群对比,发现一类柔膜菌纲的菌群,在水样中占比 0.05%,在底泥中小于 0.05%,在鳃(发病与健康)中均为 0.01%,在肝胰腺(发病与健康)中分别为 45.43%和 2.08%,在肠道(发病与健康)中分别为 11.02%和 5.83%。其在水样、

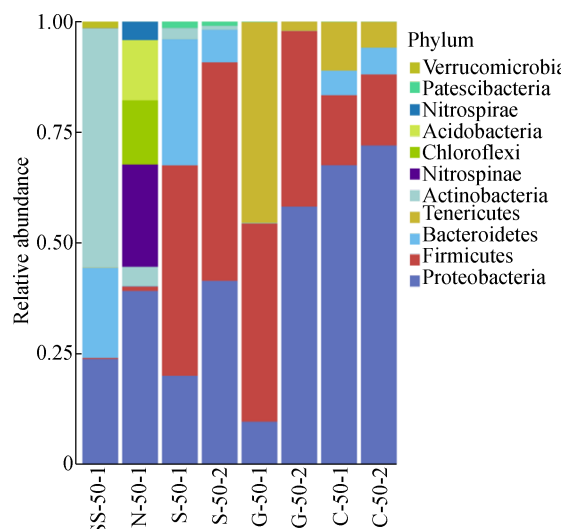


图 4 基于门水平各样品中微生物菌群相对丰度

泥样和鳃组织均为 0.05% 及以下,各样本中均有,但占比很少。在正常河蟹肝胰腺占比 2.08%,而肝胰腺“白化”个体占比达到 45.43%(表 3)。

表 3 各样品丰度最高的 3 个优势菌群

样本序号	第一优势群及占比	第二优势群及占比	第三优势群及占比	其他及占比
SS-50-1	放线菌门 Actinobacteria (53.04%)	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(22.59%)	拟杆菌纲 Bacteroidia (18.42%)	柔膜菌纲 Mollicutes (0.05%)
N-50-1	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(30.77%)	P9X2b3D02 (23.12%)	厌氧绳菌纲 Anaerolineae (11.43%)	柔膜菌纲 Mollicutes (<0.05%)
S-50-1	梭菌 Clostridia (42.88%)	拟杆菌纲 Bacteroidia (28.5%)	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(17.79%)	柔膜菌纲 Mollicutes (0.01%)
S-50-2	梭菌 Clostridia (45.64%)	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(39.95%)	拟杆菌纲 Bacteroidia (7.35%)	柔膜菌纲 Mollicutes (0.01%)
G-50-1	柔膜菌纲 Mollicutes (45.43%)	杆菌 Bacilli (40.9%)	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(9.45%)	
G-50-2	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(58.21%)	梭菌属 Clostridia (25.38%)	杆菌 Bacilli (14.28%)	柔膜菌纲 Mollicutes (2.08%)
C-50-1	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(66.94%)	柔膜菌纲 Mollicutes (11.02%)	杆菌 Bacilli (9.29%)	
C-50-2	γ -变形菌 Gammaproteobacteria(71.59%)	杆菌 Bacilli (9.95%)	拟杆菌纲 Bacteroidia (6.04%)	柔膜菌纲 Mollicutes (5.83%)

3 结论与讨论

由 Chao 提出的 ACE 指数和 Chao1 指数均是评估群落中含有 OTU 数目的指数,是生态学中用来计算物种丰度的常用指数。本次采集样品的 ACE 指数和 Chao1 指数均显示水样中菌群丰度最高,其余依次为泥样、肠道、鳃,肝胰腺丰度最低。对比河蟹组织样品在发病前后的菌群丰度发现,发病后鳃和肝胰腺组织的菌群丰度均增加,肠道组织丰度减少,肝胰腺丰度增加最为明显。用(Un)weighted unifracs 距离矩阵热图分析各样品间菌群多样性差异结果,也显示河蟹组织中发病前后肝胰腺差异性最大,这个结论与河蟹在肝胰腺组织出现“白化”症状吻合。Shannon 指数常用于反映 α 多样性指数,用来估算样本中微生物多样性。本次采集样品的 Shannon 指数显示泥样中微生物菌群多样性最高,其余依次为水样、鳃、肠道,肝胰腺多样性最低。对比各组织样品在发病前后的菌群多样性发现,发病后鳃和肝胰腺组织菌群多样性均降低,肠道组织多样性增加。结合丰度和多样性分析发现,养殖环境中水样菌群丰度大于底泥,但水样的菌群多样性却小于底泥。蟹体中发病前后鳃、肝胰腺和肠道组织的菌群丰度和多样性成反比。当一组织内菌群丰度增加后,其多样性会降低;当一组织内菌群丰度降低后,其多样性会增加。

TOP30 属水平微生物差异分析,水样、底泥与河蟹鳃、肝胰腺和肠道组织的距离都相对较远,说明其与河蟹组织的微生物群落相似度低。河蟹体发病与健康群落相似度差异对比,鳃>肝胰腺>肠道。发病前后菌群差异化说明了外来菌群对组织常驻菌群的侵占过程,理论上差异性越大的组织受外来菌群侵占的时间越长,菌群结构的改变也越大,以此分析外来菌群对蟹体的侵染过程:首先在鳃组织,其后为肝胰腺,最后为肠道。这与水产养殖动物机体防御屏障机制相吻合,首先第一道屏障为甲壳、体表黏液和鳃组织等,第二道屏障为内脏组织,第三道屏障为血液和免疫细胞等。

在门分类水平下和各样品丰度最高 3 个优势菌群对比微生物组成变化,发现无壁菌门(Tenericutes)柔膜菌纲的菌群,其在水样、泥样和发病前后鳃部丰度占比在 0.05% 及以下,占比很少。在健康河蟹肝胰腺中占比 2.08%,发病河蟹肝胰腺中占比则达到 45.43%,发病前后肠道内菌群丰度也由 5.83% 提升至 11.03%。发病过程中肝胰腺和肠道柔膜菌纲菌群大量繁殖,占比出现巨大上升,肝胰腺丰度提高最为明显,这与肝胰腺“白化”症状相吻合。笔者认为环境因素在整个发病过程中起到了重要的作用,发病前经历强对流天气,出现连续暴雨,池塘环境的剧烈变化,导致机体耐受力下降,体弱个体体内柔膜菌纲的菌群大

量增殖,属于内发。这与杨宗英等^[10]得到河蟹“水瘪子”是受到一些不利环境因素胁迫所导致的结论相同。也与近几年兴化地区“水瘪子”发病与环境的关系相符^[5]。2015年在河蟹“水瘪子”病高发时期,4—5月连续阴雨,7月“灿鸿”台风过境后,兴化市80%以上塘口出现“水瘪子”症状。2017和2018年,前期风调雨顺,六七月份连续高温、雨水偏少,河蟹“水瘪子”只有零星出现。在未进行病原回感的基础上,这些发病原因均为作者通过实验结果与养殖环境进行综合后的初步评估所得,但笔者可以确认在此病例中环境和柔膜菌纲的菌群对于河蟹肝胰腺“白化”起到了关键作用,但两个发病因子,何为原发性病原,何为继发性病原,需要进一步研究。水生动物疾病中许多病原为条件性致病,由于实验室在回感过程中无法完全模拟自然发病环境,无法完全呈现野外发病临床特征。

河蟹“水瘪子”病在2015和2016年暴发流行,2017和2018年依然还有发生,但发病率较前两年大幅减少。由于该病病因研究工作迟迟未有突破性进展,各界对于病因为病原微生物^[11]、环境^[12]或是清塘药物残留等,一直未达成统一。近几年,对于什么样发病症状为“水瘪子”病,“水瘪子”病^[13]、河蟹肝胰腺坏死病和河蟹肝胰腺病变综合征是否为同一种病,也尚有争论。因此,本文以河蟹肝胰腺“白化”这一主要症状来表述这一病例。本研究组在其他地点采集的肝胰腺“白化”河蟹也做了相关分析,发现两个地点发病过程中均出现养殖环境的恶化或气候的急剧变化,两个地点样品均存在较明显的菌群变化,但菌群变化存在差异,疾病发生与环境具有较大的相关性,与菌群变化的相关性有待进一步验证分析。

参考文献:

- [1] 王晶晶,方苹,陈静,等. 2017年江苏省水产养殖病情监测分析[J]. 水产养殖,2017(8):46—52
- [2] 宋学宏. 中华绒螯蟹肝胰腺白化症致病机理及防治技术研究[D]. 苏州:苏州大学,2007
- [3] 张凤翔,陈辉,邱军强. 2017年江苏省兴化市河蟹“水瘪子”症状流行性病学调查思考及对策[J]. 中国水产,2017(11):62—64
- [4] Bendezu I F, Slater J W, Carney B F. Identification of mytilus spp. and pecten maximus in Irish waters by standard PCR of the 18S rDNA gene and multiplex PCR of the 16S rDNA gene[J]. Marine Biotechnology (New York), 2005, 7(6): 687—696
- [5] Zhang J, Kobert K, Flouri T, et al. PEAR: a fast and accurate illumina paired-end read mergeR[J]. Bioinformatics, 2014, 30(5): 614
- [6] Frank K L, Rogers D R, Olins H C, et al. Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at middle valley hydrothermal vents[J]. Isme Journal, 2013, 7(7): 1391—1401
- [7] Coil D, Jospin G, Darling A E. A5-MiSeq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data[J]. Bioinformatics, 2015, 31(4): 587—589
- [8] Sultan M, Schulz M H, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. Science, 2008, 321: 956—960
- [9] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335—336
- [10] 杨宗英, 张一柳, 胡鲲, 等. 中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合症病原及病理学研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(1): 17—25
- [11] 陆宏达, 田全全, 贾相相, 等. 中华绒螯蟹水瘪子病不同发病阶段的病理变化特点[J]. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1242—1250
- [12] 杨宗英, 曾柳根, 王玉兰, 等. 中华绒螯蟹“水瘪子”病超微病理和病理生理研究[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(7): 1137—1148
- [13] 孙修云, 宫子慧. 浅析中华绒螯蟹“肝胰腺坏死”病与“水瘪子”病的异同[J]. 水产养殖, 2017(12): 43—45

(责任编辑:湛 江)