

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240414001

http://www.yykxjz.cn/

王锦锦, 王印庚, 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 葛建龙, 黄强, 王璐, 施国军. 福建吊笼养殖刺参肠炎病的发病特征及其菌群结构分析. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 201–216

WANG J J, WANG Y G, LI B, RONG X J, LIAO M J, GE J L, HUANG Q, WANG L, SHI G J. Enteritis in *Apostichopus japonicus* in cage culture areas in the Fujian Dongwuyang Bay: Pathogenic characteristics and bacterial community structure. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 201–216

福建吊笼养殖刺参肠炎病的发病特征 及其菌群结构分析*

王锦锦¹ 王印庚¹ 李彬¹ 荣小军¹ 廖梅杰^{1①}
葛建龙¹ 黄强² 王璐³ 施国军⁴

- (1. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;
2. 霞浦县海洋渔业发展中心 福建 宁德 355100; 3. 青岛市海洋管理保障中心 山东 青岛 266071;
4. 东营市河口区科学技术局 山东 东营 257200)

摘要 本研究以福建东吾洋海域吊笼养殖区暴发肠炎病的刺参(*Apostichopus japonicus*)为研究对象,对其发病特征、病原病理以及刺参肠道菌群结构进行解析,以期掌握该养殖模式下相关疾病的发病原因,为该区域刺参病害防控提供科学依据。流行病学调查发现,患病刺参肠道变细且肠道内含有大量积水;组织病理学结果显示,病变肠道结缔组织细胞肿大且部分崩解,排布较为松散,结缔组织与肌肉层出现分离现象。采用涂布培养法对刺参肠道及环境样品进行可培养细菌培养和占比分析,结果显示,患病刺参肠道总菌数和弧菌数均显著高于健康刺参。通过对 16S rDNA 可变区 V3~V4 区域进行高通量测序,菌群结构分析结果显示,检测到的细菌归属于 25 门、311 科,健康组肠道排名前三的优势菌科为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、杆菌科(Bacillaceae)和毛螺菌科(Lachnospiraceae),相对丰度分别为 8.69%、5.53%和 5.12%;而患病组肠道排名前三的优势菌科依次为立克次体科(Rickettsiaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和肠杆菌科,相对丰度分别为 12.66%、8.22%和 5.71%,患病组的弧菌科丰度显著高于健康组,环境样品中混合饲料的弧菌科相对丰度最高,达到 34.99%。PCoA 分析及 UPGMA 聚类分析显示,各组样品聚类良好,且混合饲料菌群类别与肠道菌群较为接近。在差异菌群的高丰度操作分类单元(OTU)定位分析中,相对丰度高于 0.5%的 OTU 主要定位到泥单胞菌属(*Lutimonas*)、另类弧菌属(*Aliivibrio*)和华美菌属(*Formosa*),且弧菌属(*Vibrio*)多为致病菌,华美菌属多为益生菌,高丰度 OTU 在健康组和患病组的肠道中差异显著。上述结果表明,患病刺参肠道组织结构发生改变,且肠道中的大量弧菌主要来源于混合饲料,刺参饵料中的大量菌群对其健康具有一定的威胁性,益生菌在健康刺参肠道中的含量高于患病刺参,致病菌在患病刺参中的含量高于健康刺参。相关研究结果将有助于为潜在益生菌的开发利用和潜在病原菌的筛查提供科学依据,并进一步推动刺参饵料的优化,为科学养殖及病害防控提供理论依据。

* 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室开放课题(2022ESHML03)、青岛市重点研发计划(22-3-3-hygg-1-hy)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费(2023TD29)和霞浦县政府采购项目(350921MJHDY2021002)共同资助。王锦锦, Email: wangjinjin@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 廖梅杰, 研究员, Email: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-04-14, 收修改稿日期: 2024-05-06

关键词 刺参; 肠炎病; 混合饲料; 菌群结构; 高通量测序

中图分类号 S947.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0201-16

刺参(*Apostichopus japonicus*)又称仿刺参, 属于棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea), 2022年, 海参养殖总面积为25.04万 hm^2 , 总产量为24.85万t(农业农村部渔业渔政管理局等, 2022), 成为我国第五次海水养殖浪潮的代表性物种。产业发展初期, 刺参养殖的主产区主要位于其自然分布区, 养殖模式包括工厂化养殖、池塘养殖、底播增殖等。近年来, 海参产业逐步向南拓展, 福建地区利用冬季南方海域水温优势开创了吊笼养殖, 以占全国不足1%的养殖面积生产出占全国产量18%的养殖海参, 打造了“北参南养”的新模式, 成为海参产业发展的一股中坚力量。然而, 由于该地区海参养殖产业发展时间较短, 养殖工艺较为粗放, 随着养殖产业的扩大, 近年来养殖病害频发, 养殖成活率和增重率也受到较大影响。病害问题逐渐成为产业发展的主要影响因素之一, 肠炎病、腐皮综合征、寄生虫病等在养殖区广泛流行。但目前关于吊笼养殖模式下刺参病原病理等相关研究较少, 仅见有刺参腐皮综合症的相关报道(王丽莉等, 2022)。因此, 聚焦该养殖模式下病害防控问题对保障产业可持续发展至关重要。

2022年3月, 福建东吾洋海域吊笼养殖的刺参发生了严重的病害, 感染对象是体长为10~15 cm、体重为60~100 g的刺参。发病个体的主要症状有厌食、滞长甚至萎缩、附着力差, 解剖后发现刺参肠道间断性空肠, 空肠部位有大量黄色粘液或者脓状物质, 肠道壁变脆、韧性差且易断裂, 结合前期研究报道, 将该病确诊为肠炎病(逢慧娟等, 2017)。目前, 大量学者采用高通量测序等相关技术手段进行环境菌群与病害发生的研究, 从而找出环境菌群与病害发生的相关性(高闯等, 2023; 孙真等, 2023)。为研究霞浦地区刺参肠炎病的发病特征及其发病状态下的肠道菌群变化, 本研究对东吾洋海域吊笼养殖区进行样品采集, 收集刺参生长区域的环境样品和肠道样品进行可培养细菌分析, 并对肠道菌群及环境菌群进行高通量测序分析, 以期对刺参肠炎病的防治、刺参生长环境的优化及其健康养殖提供科学的理论依据及数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集

根据养殖区发病情况, 本研究选取福建省霞浦县

东吾洋海域刺参吊笼养殖集中区患病较严重的养殖渔排为采样点(26°37'N, 119°55'E), 选取养殖区域中生长状况良好的刺参(H)和生长迟缓的患病刺参(D)用于病原病理及菌群分析, 同时采集该养殖区的水样(W)、网箱附着物(A)和所投喂的混合饲料(FC), 每个样品均采集3个平行, 低温运送回实验室进行相关分析。

1.2 病理分析

将所获取刺参运回实验室进行解剖, 取肠道进行形态特征观察, 比较健康刺参与患病刺参肠道差异, 并将刺参肠道采用Davidson's固定液进行组织固定, 制作石蜡切片后, 使用Nikon E800光学显微镜观察其显微结构变化并拍照记录。

1.3 可培养细菌平板计数

在无菌条件下, 将各组海参肠道分离后, 去除肠道内容物, 分别称重, 加入1 mL灭菌生理盐水, 充分研磨, 取100 μL 适当稀释后的研磨液于TSB和TCBS平板上均匀涂布, 每个样品3个重复, 28℃培养24 h后进行计数, 并根据稀释倍数计算样品中可培养细菌总数及弧菌总数。

在无菌条件下, 将水样、混合饲料、网箱附着物稀释适当倍数后取100 μL 于TSB和TCBS平板上均匀涂布, 每个样品3个重复, 28℃培养24 h后进行计数, 并根据稀释倍数计算样品中可培养细菌总数及弧菌总数。

1.4 菌群结构分析

采用E.Z.N.A. Soil DNA试剂盒(Omega Biotek)提取所采集样品的DNA, 使用16S rDNA的V3~V4区特异引物338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行PCR扩增, PCR产物回收构建测序文库, 利用Illumina HiSeq平台对所构建的文库进行高通量测序, 对原始数据进行拼接、过滤、去除嵌合体等, 最终获得有效序列。使用Usearch (V10.0)软件, 以Reads在97.0%的相似度水平下, 对序列进行聚类以获得操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。采用RDP classifier软件进行物种分类, 分类阈值选择0.8, 低于该阈值的分类结果划归为unclassified一类, 采用Mothur (V1.30)软件对样品序列进行多样性分析。采

用 QIIME2 (<https://qiime2.org/org/>)进行 Alpha 多样性分析, 包括 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数的分析。基于百迈克云平台的数据分析软件(<https://international.biocloud.net/zh/dashboard>), 进行 Beta 多样性分析, 包括 PCoA (principal co-ordinates analysis)、UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 和 Anosim (analysis of similarities)。基于物种分类结果, 得到在不同水平上各 Rank 的丰度值, 采用 STAMP 软件, 比较样本及组间丰度差异, 进行 LEfSe (LDA effect size)分析, 筛选条件为 $P < 0.05$ 。根据健康和患病组的肠道菌群结构, 利用百迈克云平台的数据分析软件 (<https://international.biocloud.net/zh/dashboard>) 挑选健康组和患病组在科水平上具有显著差异的菌群进行其 OTU 差异分析, 筛选条件为 OTU 相对丰度 $\geq 0.01\%$, 将筛选出的 OTU 定位到属水平, 并进行健康组与患病组相应 OTU 的对比分析。

2 结果

2.1 患病刺参肠道特征

通过对比解剖获得的健康及患病刺参肠道可以发现, 生长状况良好的刺参肠道饱满, 内容物丰富, 肠道内无积水, 肠壁韧性较强, 不易断裂; 患病刺参

肠道内食物较少, 部分肠道萎缩, 肠道间断性空肠, 空肠部位有大量黄色粘液或脓状物质, 肠道壁变脆、韧性差且易断裂(图 1)。

2.2 刺参肠道病理特征

通过对比患病和健康刺参肠道组织切片可以看出, 正常刺参肠道外膜层、肌肉层、结缔组织及肠腔界限明显; 患病刺参肠道外膜层、肌肉层、结缔组织及肠腔界限模糊, 肌肉层和外膜层相对着色较浅, 外膜层变薄。正常刺参结缔组织较为致密; 而患病刺参结缔组织细胞肿大且部分崩解, 排布较为松散, 结缔组织与肌肉层出现分离现象, 大量细胞坏死、脱落、弥散(图 2), 说明患病刺参肠道受损, 影响了对食物的摄取和吸收。

2.3 不同样品可培养细菌分析

对刺参肠道及环境样品进行微生物培养后, 对可培养细菌和弧菌数量分别进行统计(表 1), 结果显示, 健康刺参肠道可培养细菌数量为 $(8.00 \pm 1.00) \times 10^5$ CFU/g, 弧菌数量为 $(3.50 \pm 0.50) \times 10^5$ CFU/g, 弧菌占比为 $(45.24 \pm 11.90)\%$, 患病刺参肠道可培养细菌数量为 $(3.50 \pm 0.20) \times 10^6$ CFU/g, 弧菌数量为 $(2.30 \pm 0.50) \times 10^6$ CFU/g, 弧菌占比为 $(65.11 \pm 10.57)\%$ 。环境样品中的可培养细菌总数为 $9.60 \times 10^3 \sim 2.60 \times 10^7$ CFU/mL, 弧菌数量为 $2.00 \times 10^2 \sim 1.72 \times 10^7$ CFU/mL, 弧菌占比为 $2.19\% \sim 66.10\%$ 。结果表

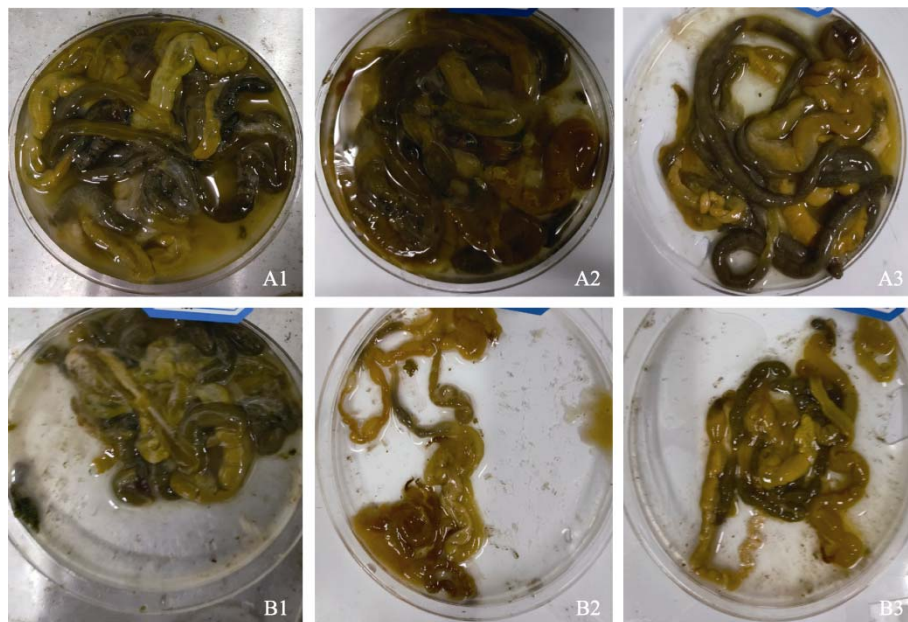


图 1 不同健康状况的刺参肠道

Fig.1 Intestinal tract of sea cucumber of different health status

A1、A2、A3: 健康组; B1、B2、B3: 患病组。

A1, A2, A3: Healthy groups; B1, B2, B3: Diseased groups.

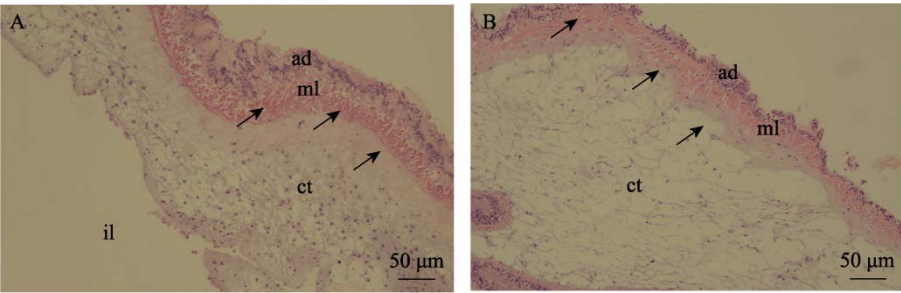


图 2 正常刺参(A)和患病刺参(B)肠道组织结构的显微观察
Fig.2 Microscopic observation of the intestine of healthy (A) and sick (B) sea cucumbers

↗: A、B 图显微结构的具体差异位点。ad: 外膜层; ml: 肌肉层; il: 肠腔; ct: 结缔组织。
↗: Specific differences in the microstructure of figure A and B.
ad: Adventitia; ml: Muscular layer; il: Intestine lumen; ct: Connective tissue.

表 1 刺参肠道及环境样品可培养细菌丰度及弧菌比例

Tab.1 Abundance of culturable bacteria and <i>Vibrio</i> spp. proportion in intestinal of sea cucumber and environmental samples				
样品类型 Sample type	编号 Number	可培养细菌数量 Number of culturable bacteria	弧菌数量 Number of <i>Vibrio</i> spp.	弧菌占比 Proportion of <i>Vibrio</i> spp./%
健康肠道 Healthy intestinal tract	H	$(8.00\pm1.00)\times10^5$ CFU/g ^c	$(3.50\pm0.50)\times10^5$ CFU/g ^c	45.24 ± 11.90^{ab}
患病肠道 Diseased intestinal tract	D	$(3.50\pm0.20)\times10^6$ CFU/g ^b	$(2.30\pm0.50)\times10^6$ CFU/g ^b	65.11 ± 10.57^a
水 Water	W	$(9.60\pm2.00)\times10^3$ CFU/mL ^d	$(2.00\pm0.00)\times10^2$ CFU/mL ^d	2.19 ± 0.36^b
网箱附着物 Cage attachments	A	$(3.40\pm0.40)\times10^6$ CFU/g ^b	$(4.85\pm0.95)\times10^5$ CFU/g ^b	14.78 ± 4.52^b
混合饲料 Mixed feed	FC	$(2.60\pm0.30)\times10^7$ CFU/g ^a	$(1.72\pm0.21)\times10^7$ CFU/g ^a	66.10 ± 0.45^a

注: 表中数据为平均数±标准差; 同列数值后不同字母表示处理间差异达到显著水平($P<0.05$), 下同。

Note: Data in the table are Mean±SD, different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level, the same below.

明,混合饲料中的可培养细菌及弧菌数量显著高于其他样品,健康组可培养细菌和弧菌数量显著低于患病组。

2.4 高通量测序分析

2.4.1 不同样品菌群序列丰度分析 对所采集的 15 个样本进行高通量测序,各样品获得的原始测序序列分别为 64 798~81 541 条,经质量控制、嵌合体和非靶区域序列去除后,15 个样品所得有效序列为 64 430~81 233 条,有效序列占比为 89.10%~96.05%,分别获得 413~1 034 个 OTU,能够真实反映样本菌群组成情况。对 5 个组的 OTU 构建 Venn 图(图 3),结果显示,H、D、W、A 和 FC 组样品 OTU 数量分别为 1 010、1 165、961、1 187 和 879,从高到低依次为 A、D、H、W 和 FC,且刺参肠道菌群的 OTU 数目高于水和混合饲料菌群。5 个组共同拥有的 OTU 有 492 个,H 组与 A、FC 和 W 组共同拥有的 OTU 数分别为 1、4 和 4,低于 D 组与 A、FC 和 W 组分别共有的 OTU 个数(27、5、7),各组独有 OTU 数目分别为 H 组 3 个、

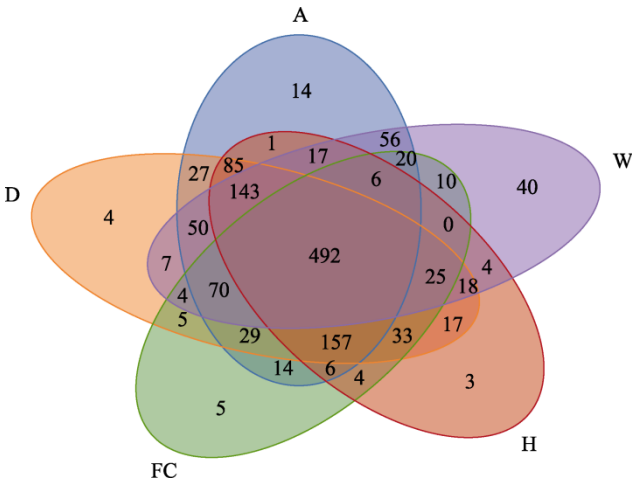


图 3 肠道和环境样品 Venn 图
Fig.3 Venn diagram of intestinal and environmental samples
H: 健康肠道; D: 患病肠道; A: 网箱附着物;
W: 水; FC: 混合饲料。下同。
H: Healthy intestinal tract; D: Diseased intestinal tract;
A: Cage attachments; W: Water; FC: Mixed feed.
The same below.

D组4个、W组40个、A组14个、FC组5个。

2.4.2 刺参肠道及环境菌群结构特征分析 通过对健康组和患病组肠道、水、网箱附着物、混合饲料进行菌群结构特征分析发现, 15个样品检测到的细菌归属于25门、54纲、161目、311科、614属。在科水平上, 选择丰度最高的10个菌群构建相对丰度图, 结果见图4, 可以看出, 健康组中位于前三的优势菌科依次为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、杆菌科(Bacillaceae)和毛螺菌科(Lachnospiraceae), 相对丰度分别为8.69%、5.53%和5.12%; 患病组中位于前三的优势菌科依次为立克次体科(Rickettsiaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和肠杆菌科, 相对丰度分别为12.66%、8.22%和5.71%; 网箱附着物中位于前三的优势菌科分别为红杆菌科(Rhodobacteraceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)和黄杆菌科(Flavobacteriaceae), 相对丰度分别为41.95%、13.50%和8.89%; 水样中位于前三的优势菌科分别为红杆菌科、黄杆菌科和弧菌科, 相对丰度分别为15.95%、14.52%和8.76%; 混合饲料中位于前三的优势菌科分别为弧菌科、莫拉菌科和盐单胞菌科(Halomonadaceae), 相对丰度分别为34.99%、17.64%和11.63%。患病组中的弧菌科、立克次体科的相对丰度显著高于健康组, 而杆菌科和毛螺菌科的丰度显著低于健康组, 混合饲料中的弧菌科显著高于其他样品($P<0.05$)。

2.4.3 刺参肠道及环境菌群多样性分析 对5组样品所获得菌群的 α 多样性指数(alpha diversity index)

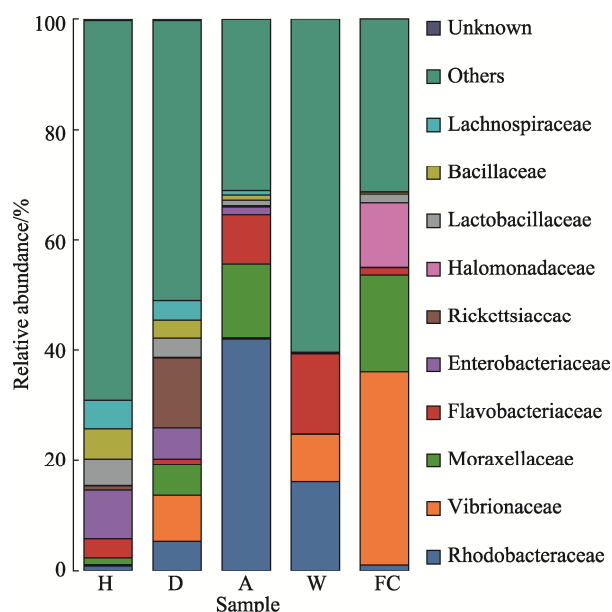


图4 基于科水平的肠道和环境菌群相对丰度

Fig.4 Relative abundance of intestinal flora and environmental flora based on family level

分析结果见表2, 健康刺参和患病刺参肠道菌群丰富度(以ACE指数和Chao1指数衡量)分别为 805.4 ± 24.35 和 825.97 ± 21.66 , 911.90 ± 49.69 和 926.71 ± 54.31 , 患病组高于健康组, 二者显著低于网箱附着物(1039.29 ± 30.02 和 1024.79 ± 50.22)中的菌群丰富度($P<0.05$)。在菌群多样性方面(以Shannon指数衡量), 健康刺参和患病刺参肠道菌群多样性分别为 7.99 ± 0.03 和 7.90 ± 0.25 , 健康组高于患病组, 二者显著高于网箱附着物(6.50 ± 0.32)、水样(6.24 ± 0.18)和混合饲料(4.43 ± 0.42)中的菌群多样性($P<0.05$); 各组样品的Simpson指数在0.91~0.99之间, 无显著差异。

为进一步探究5组样本间微生物群落的相似性, 在OTU水平上, 采用unweighted unifracc算法对不同地区的健康刺参肠道、患病刺参肠道、环境样品和混合饲料进行三维主坐标分析(图5)。其中, PCoA1(principal co-ordinates analysis 1)的贡献率为33.01%, PCoA2的贡献率为22.50%, PCoA3的贡献率为12.14%, 总贡献率为67.65%。图5显示, 所有分组的样本呈现较好的聚类趋势, 刺参肠道菌群与环境菌群分离, 健康刺参和患病刺参肠道菌群被分为两簇, 水和混合饲料具有一部分重合, 可能与饲料用养殖区海水配制有关。采用UPGMA对样品进行层次聚类, 以判断各样品间物种组成的相似性。样品层次聚类树(图6)表明, 各组样品分别聚为一支, 健康组肠道与患病组肠道的两支聚在一起并有所交叉, 表明两组样品物种组成较为相似, 然后再与混合饲料的一支聚在一起, 水样与网箱附着物样品的两支聚在一起, 反映水样和网箱的物种组成与另外3组样品中的物种组成差异较大。对多维度数据组间相似性进行Anosim分析, 得到组间距离箱线图(图7), 不同分组样品之间的组间差异高于组内差异, 表明各组样品的3个

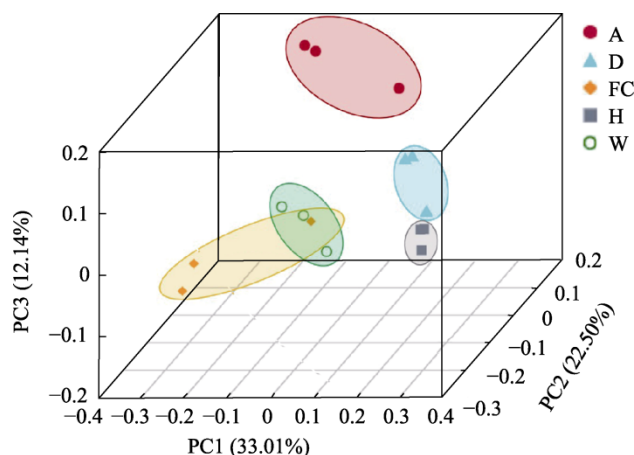


图5 肠道及环境菌群PCoA分析

Fig.5 PCoA analysis of intestinal flora and environmental flora

表 2 肠道及环境菌群 α 多样性指数
Tab.2 Alpha diversity index of intestinal flora and environmental flora

样品 Sampling	编号 Number	ACE 指数 Index of ACE	Chao1 指数 Index of Chao1	Simpson 指数 Index of Simpson	Shannon 指数 Index of Shannon
健康肠道 Healthy intestinal tract	H	805.40±24.35 ^b	825.97±21.66 ^b	0.99±0.00 ^a	7.99±0.03 ^a
患病肠道 Diseased intestinal tract	D	911.90±49.69 ^{bc}	926.71±54.31 ^{ab}	0.98±0.01 ^a	7.90±0.25 ^a
水 Water	W	920.30±37.01 ^b	899.15±39.07 ^b	0.97±0.00 ^a	6.24±0.18 ^b
网箱附着物 Cage attachments	A	1 039.29±30.02 ^a	1 024.79±50.22 ^a	0.96±0.01 ^a	6.50±0.32 ^b
混合饲料 Mixed feed	FC	811.06±173.82 ^{bc}	739.33±147.33 ^b	0.91±0.01 ^a	4.43±0.42 ^b

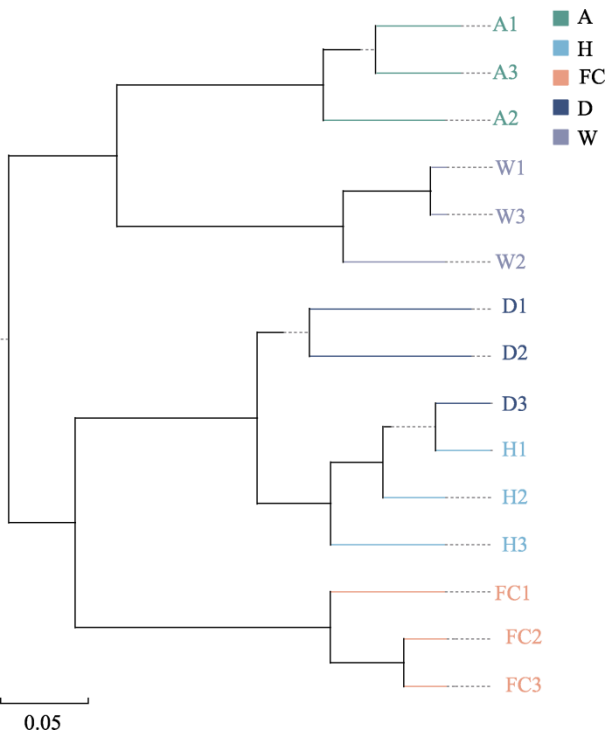


图 6 基于微生物群落结构的肠道与环境菌群聚类分析
Fig.6 Cluster analysis of intestinal flora and environmental flora

平行间重复性较好,患病组与健康组及环境菌群间均存在显著差异($R^2=0.915$, $P=0.001$)。

2.4.4 不同样品差异菌群结构特征分析 为进一步研究健康组与患病组肠道菌群差异,探索肠道菌群与环境菌群的差异状况,本研究对健康组肠道、患病组肠道、水样、网箱附着物及混合饲料的菌群进行 LEfSe 分析,构建差异菌群物种信息树状图(图 8a),并筛选在不同组中存在显著差异($P<0.05$)的菌群(图 8b)。对 LDA 判别值大于 4 的菌群进行分析,共有 135 个菌群在 5 组样品间存在显著差异,这些差异显著菌群主要来自变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)和放线菌门(Fusobacteriota)共 6 个门。其中,健康刺参肠道中的

差异菌群数目最多,主要为来自拟杆菌门的拟杆菌目(Bacteroidales)、黄杆菌目(Flavobacteriales),厚壁菌门的颤螺菌目(Oscillospirales)、毛螺菌目(Lachnospirales)、乳杆菌目(Lactobacillales)、丹毒丝菌目(Erysipelotrichales)、芽孢杆菌目(Bacillales),变形菌门的肠杆菌目(Enterobacteriales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、醋酸杆菌目(Acetobacteriales),梭杆菌门的梭杆菌目(Fusobacteriales)的 40 个特异性菌群;其次为水样中的菌群,主要为来自于变形菌门的鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、红杆菌目(Rhodobacteriales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)和拟杆菌门的黄杆菌目(Flavobacteriales)的 37 个特异性菌群;而患病组肠道中的差异菌群数目最少,主要为来自变形菌门立克次体目(Rickettsiales)的 4 个特异性菌群。

为进一步研究健康刺参肠道和患病刺参肠道菌群差异,根据图 4 中健康和患病组的肠道菌群结构,挑选出健康和患病组在科水平上具有显著差异的弧菌科(表 3)和黄杆菌科(表 4)的菌群进行其 OTU 差异的进一步探讨。在科水平上,弧菌科在健康和患病组中的占比分别为 0.23%和 8.22%,在弧菌科中筛选到相对丰度在 0.01%以上的 OTU 12 个;黄杆菌科在健

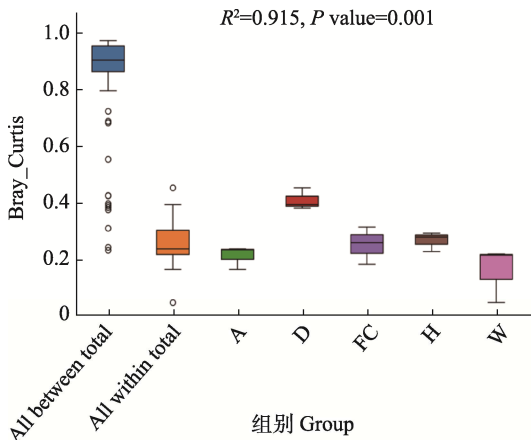
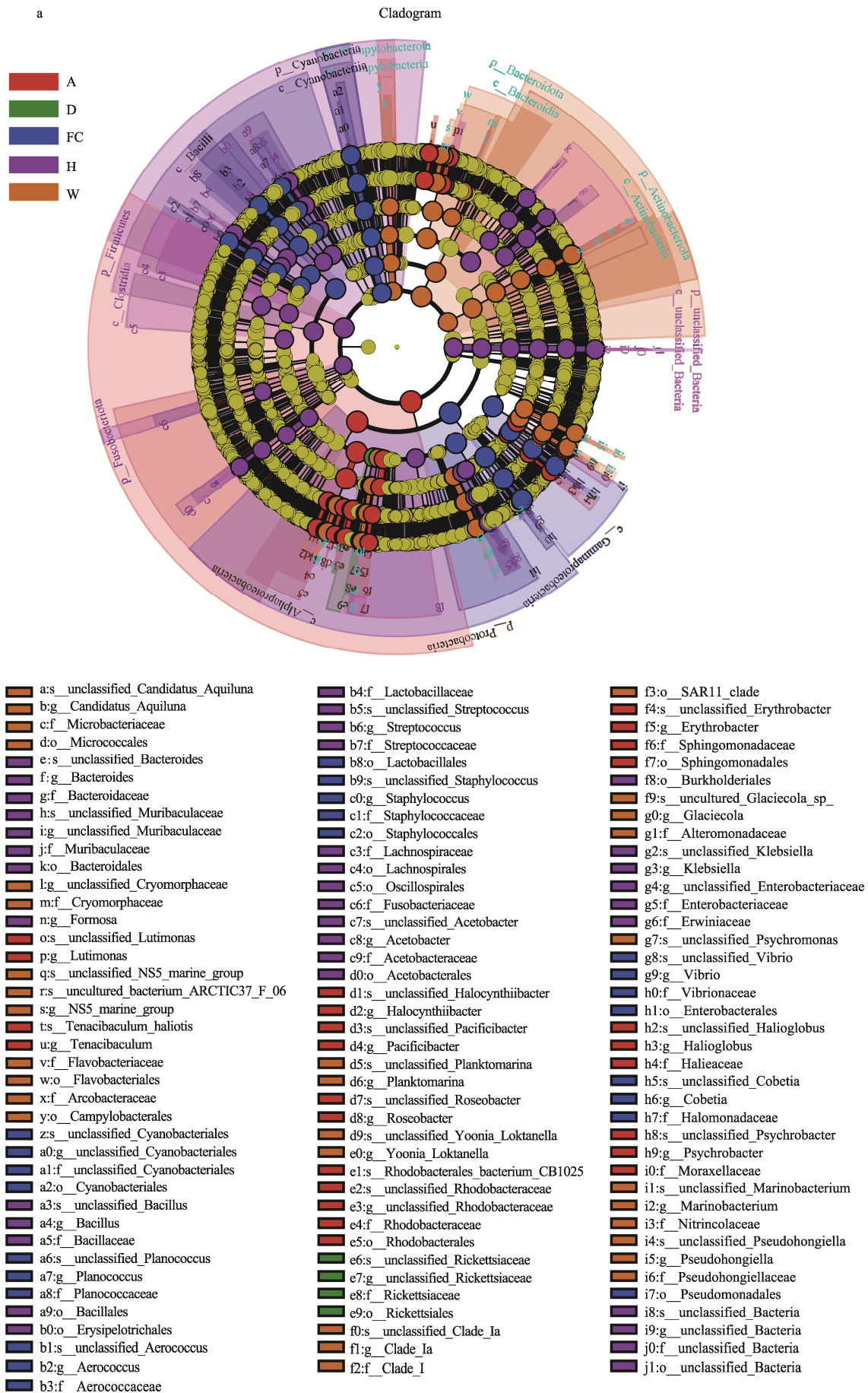
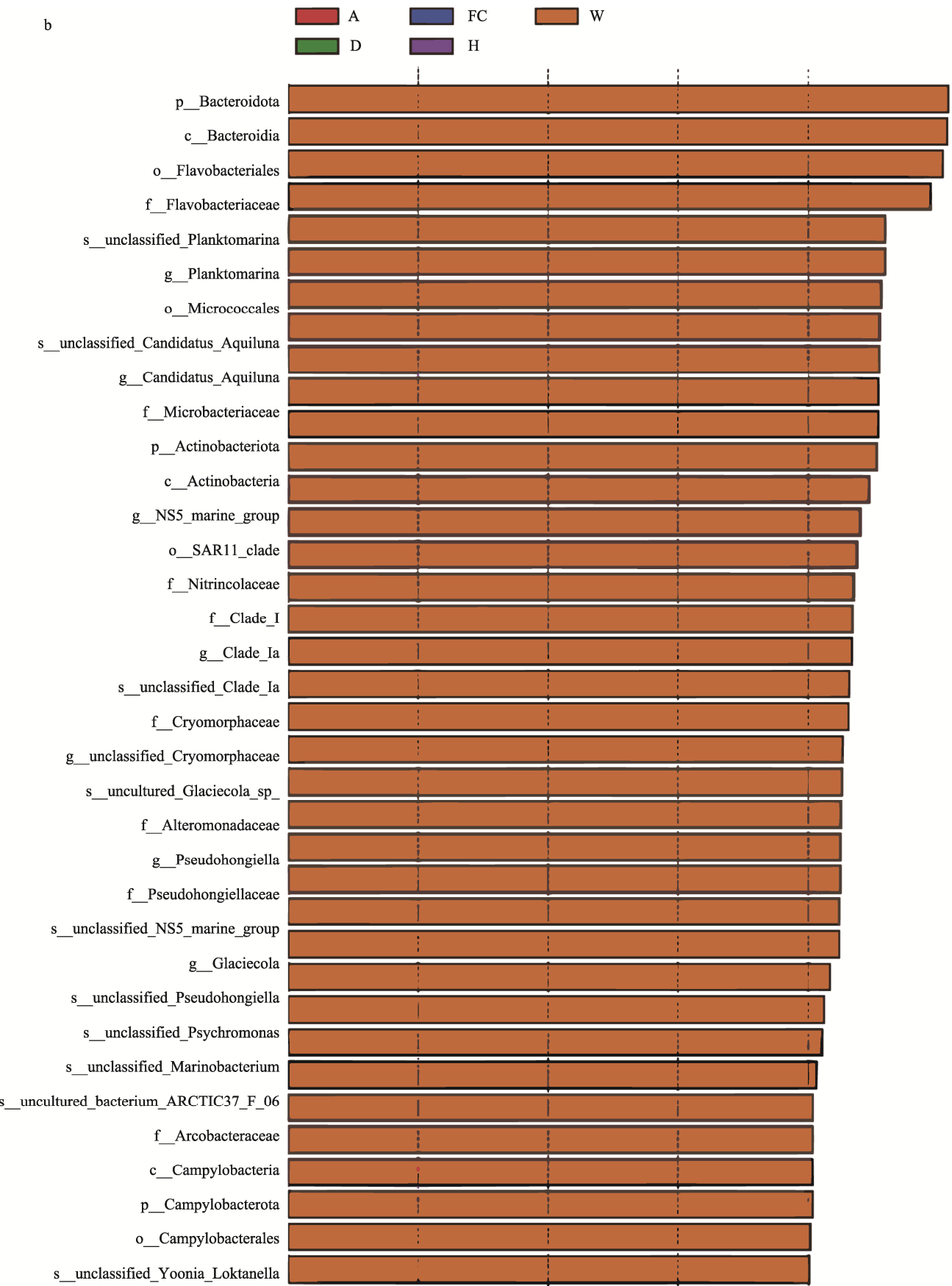
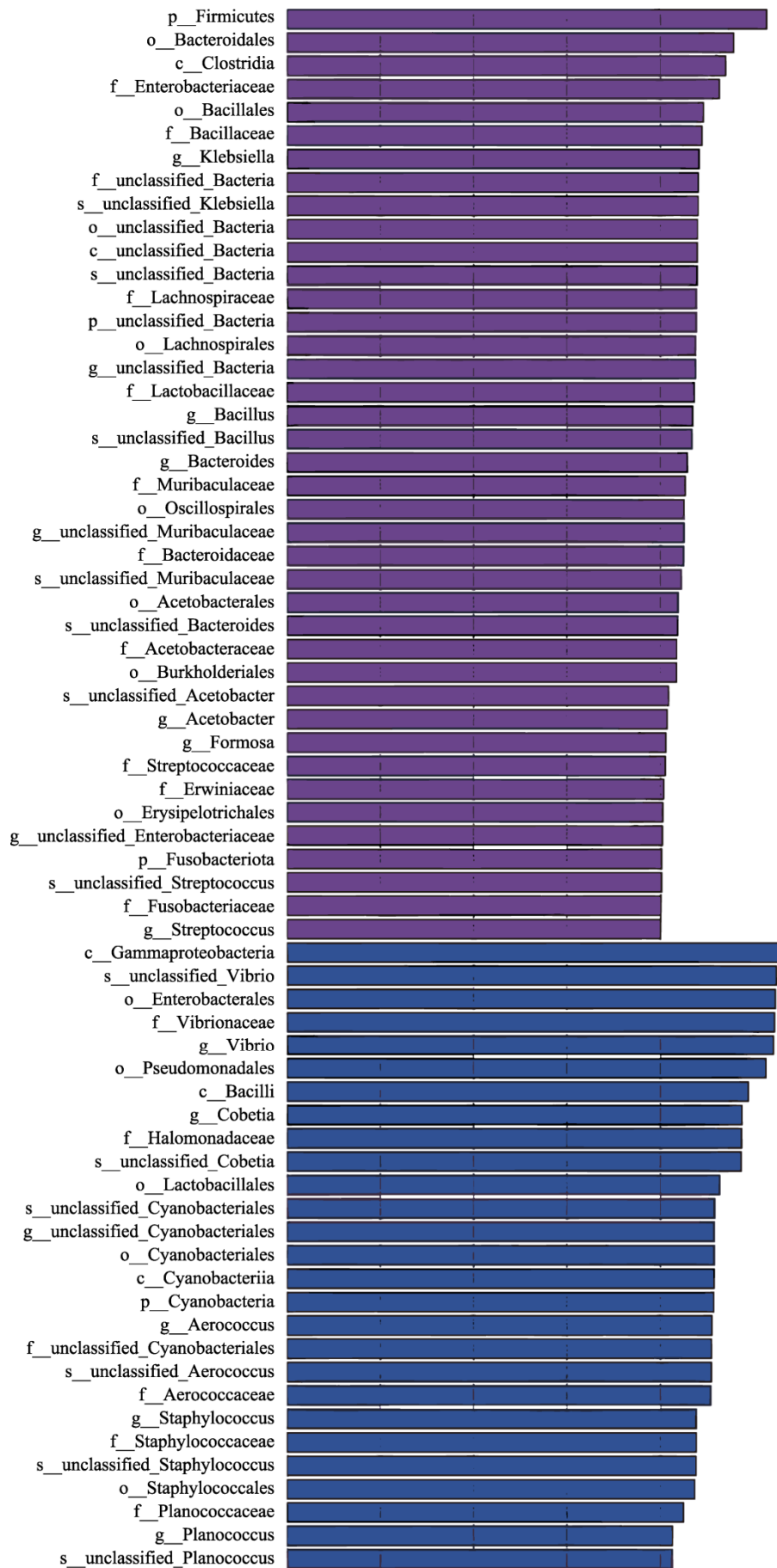


图 7 各组样品 Anosim 分析距离箱线图
Fig.7 The distance box diagram based on the Anosim analysis in different groups







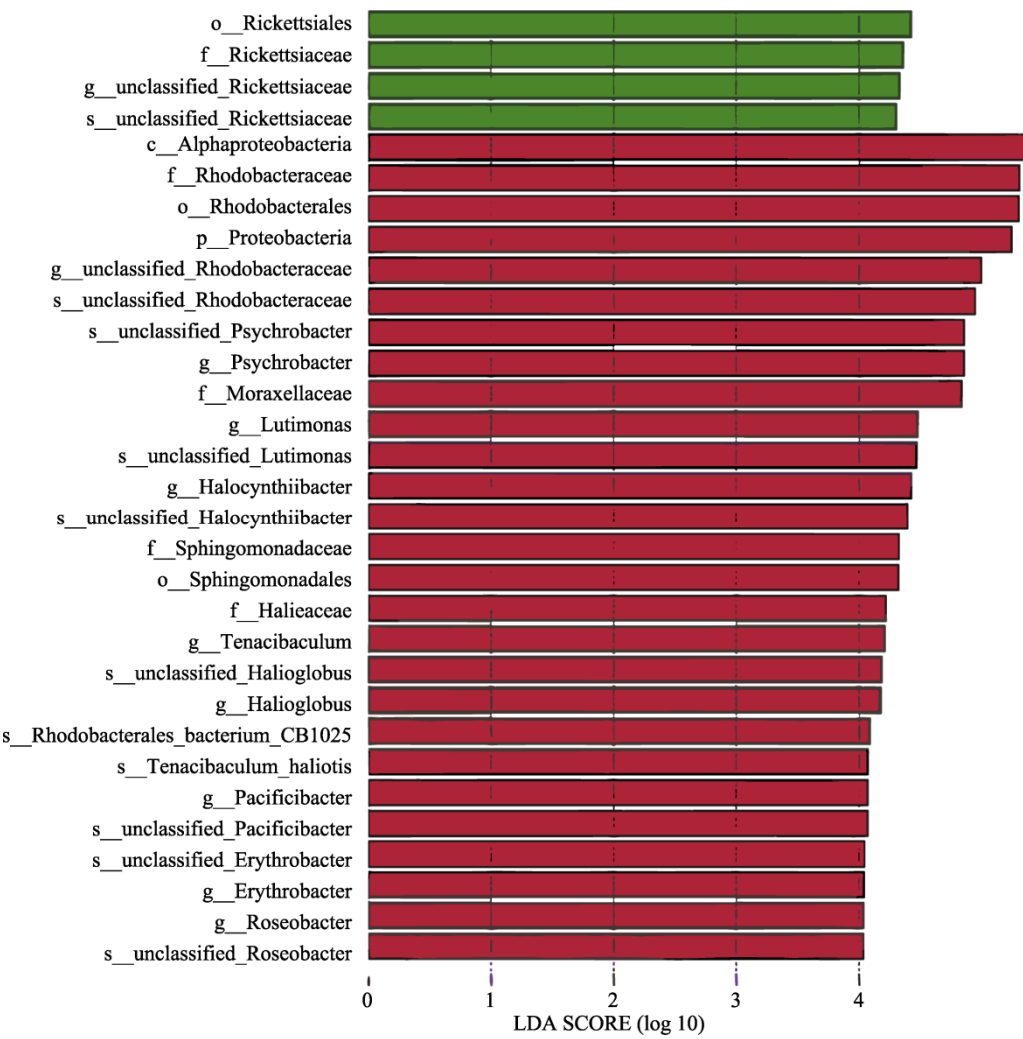


图 8 肠道及环境菌群 LEfSe 分析环形树状图(a)和柱状图(b)

Fig.8 LEfSe analysis annular tree diagram (a) and histogram (b) of intestinal flora and environmental flora

表 3 弧菌科中不同 OTU 在肠道菌群中的丰度差异分析

Tab.3 Analysis of abundance difference of different OTU in intestinal flora of Vibrionaceae

名称 Name	属水平菌群种类 Species of genus level	患病/健康 Diseased/Healthy	患病组 OTU 丰度占比 Proportion of OTU abundance in the diseased group/%	健康组 OTU 丰度占比 Proportion of OTU abundance in the healthy group/%
OTU2961	<i>Aliivibrio</i>	14.13	0.79	0.06
OTU103	<i>Photobacterium</i>	0.56	0.00	0.01
OTU96	<i>Photobacterium</i>	2.18	0.07	0.04
OTU15446	<i>Vibrio</i>	6.11	0.03	0.01
OTU17	<i>Vibrio</i>	16.47	0.75	0.05
OTU273	<i>Vibrio</i>	1.12	0.07	0.07
OTU323	<i>Vibrio</i>	1.18	0.01	0.01
OTU40	<i>Vibrio</i>	5.78	0.17	0.03
OTU41	<i>Vibrio</i>	5.85	0.46	0.09
OTU5817	<i>Vibrio</i>	14.37	0.16	0.01
OTU717	<i>Vibrio</i>	0.78	0.04	0.06
OTU9	<i>Vibrio</i>	7.84	1.00	0.14

表 4 黄杆菌科中不同 OTU 在肠道菌群中的丰度差异分析
Tab.4 Analysis of abundance difference of different OTU in intestinal flora of Flavobacteriaceae

名称 Name	属水平菌群种类 Species of genus level	健康/患病 Healthy/Diseased	患病组 OTU 丰度占比 Proportion of OTU abundance in the diseased group/%	健康组 OTU 丰度占比 Proportion of OTU abundance in the healthy group/%
OTU169	<i>Aquibacter</i>	0.32	0.02	0.01
OTU42	<i>Aurantivirga</i>	0.11	0.01	0.00
OTU139	<i>Eudoraea</i>	0.15	0.05	0.01
OTU3283	<i>Flavobacterium</i>	0.11	0.02	0.00
OTU861	<i>Formosa</i>	5.05	0.09	0.49
OTU52	<i>Formosa</i>	6.43	0.26	1.83
OTU100	<i>Lutibacter</i>	0.13	0.09	0.01
OTU2974	<i>Lutibacter</i>	0.01	0.09	0.00
OTU92	<i>Lutibacter</i>	0.05	0.05	0.00
OTU29	<i>Lutimonas</i>	0.12	1.11	0.14
OTU602	<i>Nonlabens</i>	3.80	0.00	0.01
OTU13	<i>NS3a_marine_group</i>	0.73	0.01	0.01
OTU13421	<i>Polaribacter</i>	4.64	0.02	0.11
OTU28	<i>Polaribacter</i>	1.88	0.02	0.04
OTU262	<i>Winogradskyella</i>	0.75	0.01	0.01

康和患病组中的占比分别为 3.45%和 0.99%, 在黄杆菌科中筛选到相对丰度在 0.01%以上的 OTU 15 个。在弧菌科中, OTU 丰度比例在 0.50%以上的有 3 个, 分别为 OTU2961、OTU17 和 OTU9, 其中 OTU2961 定位到另类弧菌属(*Aliivibrio*), 其在患病组中的丰度是健康组丰度的 14.13 倍, OTU17 和 OTU9 都定位到弧菌属, 其在患病组中的丰度分别是健康组丰度的 16.47 倍和 7.84 倍。在黄杆菌科中, OTU 丰度比例在 0.50%以上的有 2 个, 分别为 OTU52 和 OTU92, 其中 OTU52 定位到华美菌属(*Formosa*), 其在健康组中的丰度是患病组丰度的 6.43 倍, OTU29 定位到泥单胞菌属(*Lutimonas*), 其在患病组中的丰度是健康组丰度的 8.47 倍。

3 讨论

近年来, 随着养殖技术的提高及良种推广力度的加大, 海参养殖产业规模逐步增大, 但在产业迅速发展的过程中, 病害问题也日益严重, 根据现有报道, 常见刺参病害有“化板症”(王印庚等, 2012)、“烂胃病”(邓欢等, 2004)、“溃烂病”(马悦欣等, 2006)、“腐皮综合征”(王印庚等, 2006)、肠炎病(逢慧娟等, 2017)等, 通过对患病刺参的分析, 常见的致病菌有灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)(张春云等, 2006)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)(王印庚等, 2006)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)(黄华伟等, 2010)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(杨嘉龙等, 2007)等。其

中肠炎病因为发病特征在短时间内表现不明显, 发现时已导致大量刺参滞长、身体萎缩等, 严重影响刺参产量, 对产业危害巨大。福建省作为我国海参养殖主产区之一, 养殖面积为 1 608 hm², 仅占全国海参养殖总面积的 0.64%, 其产量却达到 4.56 万 t, 占全国海参总产量的 18.36% (农业农村部渔业渔政管理局等, 2022)。刺参肠炎病的发生, 正值福建地区刺参生长的最佳季节, 病害的发生对其品质及产量影响巨大。因此, 充分掌握该地区刺参发病原因, 及时采取科学的防控措施, 保障福建地区刺参养殖业的健康发展, 对我国海参产业的整体增长具有重要意义。

3.1 刺参肠炎病发病特征分析

随着海参产业的发展, 养殖工艺也呈现出多元化趋势, 传统的“海泥+海藻粉”、“海泥+海带+鱼糜”等的投喂方式与新型的发酵饲料、工业化的片状饲料、颗粒饲料投喂等养殖方式共存, 导致养殖活动中缺乏科学化、标准化的养殖工艺。养殖过程粗放、饵料清洁度低等常会影响刺参健康, 导致肠炎病的发生。本研究中, 患肠炎病刺参个体生长率较正常海参低 0.5~1.0 倍, 且参体萎缩, 个体活力及附着力较弱, 对吊笼中投喂的饵料摄食较少, 解剖后肠道食物较少且有大量积水。病理组织观察发现, 患病刺参结缔组织细胞肿大且部分崩解, 排布较为松散, 结缔组织与肌肉层出现分离。夏青等(2015)研究发现, 利用哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)

进行攻毒实验后,其肠道出现肌层损伤和上皮细胞溃散等变化,其结果与本研究患病刺参肠道显微结构变化一致。Xia 等(2018)和 Sewaka 等(2019)研究发现,生物体肠道结构与其营养物质的吸收能力及肠道免疫密切相关,肠道结构的改变会引发一系列生物体机能的改变。本研究中的患病刺参由于肠道结构发生变化,其摄食、消化、吸收能力均受到影响,因此,刺参在患病期间难以获取充足的营养物质以供自身生长及生命活动的需要,为维持其正常的生命活动,刺参不断消耗自身营养物质,导致刺参不但出现滞长现象,而且部分患病严重的个体出现萎缩现象。由于参体营养不足,进而导致个体免疫力下降,极易受病原微生物感染,从而引发“腐皮综合征”等一系列并发症,严重影响刺参的正常生长甚至威胁其存活。

3.2 刺参肠道及环境菌群多样性分析

微生物是养殖生态系统的重要组成部分,在生态系统物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用,保持微生物菌群多样性及稳定性对养殖系统中生物体的健康生长及生态系统稳定具有重要意义(Adedire *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022; 张燕玉等, 2019)。 α 多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性,Chao1 和 ACE 指数衡量物种丰度即物种数量的多少,Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性,根据保险假说(insurance hypothesis),高生物多样性有利于提高生态系统的稳定性,从而保证生物体的正常生命活动(Yachi *et al.*, 1999)。本研究显示,Chao1、ACE 和 Shannon 指数由高到低依次为网箱附着物、水和混合饲料。研究发现,养殖水体中沉积物的菌群多样性高于水体(Zhao *et al.*, 2020; 王玉龙等, 2022),而网箱附着物上沉积的淤泥等物质属于水体中的悬浮物沉降而成,与底部沉积物类似,属于水体中的物质沉降附着而成,因而可以类比沉积物进行分析。混合饲料是由发酵的海藻及海泥等配制而成,其多样性指数较低是由于发酵用益生菌大量繁殖,占据主导地位而影响了其他微生物的繁殖(Mulyasari *et al.*, 2022; 葛玲瑞等, 2021)。在 ACE 和 Chao1 指数方面,患病组高于健康组,表明在菌群数量方面患病组较高;而在 Shannon 指数方面,健康组则高于患病组,表明健康组菌群多样性较高。结合 PCoA 分析及 UPGMA 聚类分析表明,各组样品聚类良好,且在 Anosim 分析箱线图中不同分组样品之间的组间差异高于组内差异,患病组与健康组及环境菌群间均存在显著差异,表明肠道菌群与海参健康具有一定的相关性。在 UPGMA 聚类树中,与肠道菌群的距离最近的是混合饲料,表

明环境因素中与刺参肠道菌群关系最为密切的是刺参饵料。此前,众多学者的相关研究表明,投喂的饵料与肠道菌群具有一定的相关性(李靖等, 2019; 袁春营等, 2018; 张新明等, 2022),其结果与本研究一致,进一步证明患病刺参菌群变化与投喂的饲料有关。

3.3 刺参肠道及环境菌群结构特征分析

对健康组和患病组刺参肠道及水、网箱附着物、混合饲料的菌群结构特征进行分析,结果显示,在门水平上排名前三的微生物主要来自变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,这与裴鸿霖等(2021)、谭八梅等(2021)对刺参养殖环境的菌群结构研究结果一致。在健康刺参肠道中,丰度最高的为厚壁菌门(15.55%),其次为变形菌门(11.83%),而在患病刺参肠道及水、网箱附着物和混合饲料中,丰度最高的却是变形菌门,其丰度分别为 37.62%、24.86%、57.27%和 65.35%。厚壁菌门中含有的菌群多为乳酸菌、芽孢杆菌、毛螺菌等,可以促进碳水化合物的发酵及蛋白质分解,从而有助于生物体的健康生长(Kong *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019; 刘韶娜等, 2020)。变形菌门中含有较多有害菌群如弧菌、立克次体、假交替单胞菌等,丰度过高会对生物体的健康产生一定的危害性(Wibowo *et al.*, 2021; 戚瑞荣等, 2016; 乔毅等, 2015)。LEfSe 分析显示,健康刺参肠道的差异菌群主要为拟杆菌门和厚壁菌门的 40 个菌群,包含了毛螺菌目、芽孢杆菌目、乳杆菌目等的多种益生菌,而患病组的差异菌群仅有来自变形菌门立克次体目的 4 个有害特异性菌群,这种菌群差异表明,肠道健康与菌群结构及菌群组成息息相关。本研究中的患病刺参肠道中变形菌门丰度高于健康组,水、网箱附着物和混合饲料中的变形菌门丰度也高于健康组肠道,表明肠道中高丰度的变形菌门菌群来源于环境中的水、网箱附着物和混合饲料。

对科水平上健康组和患病组中排名前十的菌群丰度进行比较发现,健康组的杆菌科(5.54%)和黄杆菌科(3.45%)丰度显著高于患病组(3.25%和 0.99%),而患病组中的弧菌科(8.22%)和立克次体科(12.66%)丰度显著高于健康组(0.23%和 0.74%)。在刺参养殖过程中,弧菌科微生物的大量繁殖常会导致刺参发病,从而影响其正常生长,严重的会威胁其存活(杨嘉龙等, 2007; 杨求华等, 2014)。通过对健康组和患病组弧菌科和黄杆菌科中 OTU 的定位分析发现,在弧菌科的 OTU 中,患病组所定位到的另类弧菌属及弧菌属丰度是健康组的 7.84~14.13 倍,而在黄杆菌科的 OTU 定位中,健康组所定位到的华美菌属的丰度是患病组的 6.43 倍,患病组定位到的泥单胞菌属的丰度是健

康组的 8.46 倍。陆振等(2016)对福建地区养殖刺参健康群体的肠道菌群分析发现, 华美菌属为优势菌。弧菌属多为有害菌(王磊等, 2023; 李辰睿等, 2023), 而华美菌属可以分解藻类中的琼脂(吴美娴等, 2022), 为生物体提供可吸收的营养物质。弧菌科和黄杆菌科定位到的 OTU 丰度的变化结果表明, 优势菌群丰度的改变影响肠道健康, 从而进一步影响刺参的生长。

在环境样品中, 混合饲料中的弧菌科生物最多, 占比 34.99%, 其次水体中的弧菌科微生物占比 8.76%。因此可以推断, 患病刺参肠道中的弧菌主要来源于所投喂的混合饲料, 而混合饲料由养殖区水体配制, 所以部分弧菌间接来源于水中。逢慧娟等(2017)进行保苗期刺参肠炎病研究发现, 其主要致病菌为哈维氏弧菌, 且该致病菌主要来源于饵料, 该结论与本研究一致。混合饲料主要由海泥、发酵后的海藻以及养殖区海水配制而成, 其中的海藻经益生菌发酵后其菌群结构较为稳定, 有害菌含量较少, 但错误的发酵方式常会导致大量有害微生物滋生; 而海泥主要来自于沿海沉积物, 其中含有大量的海洋垃圾、残饵、粪便等物质, 因而有害微生物较多; 水体中的菌群与养殖区环境具有一定的相关性, 因此, 为保证海参的健康成长, 一方面要保护好养殖区环境, 另一方面要优化投喂工艺, 采用新型清洁饵料逐步代替传统海泥混料的投喂模式, 从而减少病害的发生, 保证刺参养殖业的高产稳产。

4 结论

本研究表明, 福建霞浦地区吊笼养殖区刺参所患疾病为肠炎病, 菌群结构分析及菌群多样性分析结果表明, 肠道菌群结构改变导致发病, 患病刺参肠道中的致病菌主要来源于混合饲料。为保障刺参养殖业的健康可持续发展, 应倡导改变传统的“海带+海泥”或“海泥+海带+鱼糜”的投喂模式, 加快新型清洁饲料的研发生产与推广应用, 以达到养殖环境保护与养殖个体健康成长的双赢效果, 从而实现刺参产业的持续稳定发展。

参 考 文 献

- ADEDIRE D E, JIMOH A O, KASHIM-BELLO Z, *et al.* Microbiome diversity analysis of the bacterial community in Idah River, Kogi State, Nigeria. *Advances in Microbiology*, 2022, 12(5): 343–362
- DENG H, SUI X L. Common epidemic of *Apostichopus japonicus* in incubation period. *Fisheries Science*, 2004, 23(3): 40 [邓欢, 隋锡林. 刺参育苗期常见流行病. *水产科学*, 2004, 23(3): 40]
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2022*. Beijing: China Agriculture Press, 2022 [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. 2022 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2022]
- GE L R, AN J G, LIU K J, *et al.* Effect of yeast and *Bacillus* fermentation feed on body color, digestion and intestinal flora composition of grass goldfish (*Carassius auratus* red var). *Feed Research*, 2021, 44(9): 66–70 [葛玲瑞, 安建国, 刘科均, 等. 酵母菌和芽孢杆菌发酵饲料对草金鱼体色、消化及肠道菌群组成的影响. *饲料研究*, 2021, 44(9): 66–70]
- GAO C, LIU J Y, HAN L S, *et al.* Structural characteristics of bacterial flora in coelomatic fluid of sea urchin with “red spot syndrome disease”. *Chinese Journal of Fisheries*, 2023, 36(6): 14–23, 29 [高闯, 刘家洋, 韩玲妹, 等. 患“红斑综合征”的海胆体腔液中菌群结构特征. *水产学杂志*, 2023, 36(6): 14–23, 29]
- HUANG H W, WANG Y G, CHEN X, *et al.* Isolation and identification of cultured *Apostichopus japonicus* pathogen associated with skin ulcer syndrome in old ponds. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1460–1468 [黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 老化参池刺参腐皮综合征致病病原的分离与鉴定. *水产学报*, 2010, 34(9): 1460–1468]
- KONG Y D, LI M, LI R M, *et al.* Evaluation of cholesterol lowering property and antibacterial activity of two potential lactic acid bacteria isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa argus*). *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100342
- LI C R, XU R L, ZHANG X X, *et al.* Genome analysis of pathogenic *Vibrio harveyi* strain TS-628. *Journal of Fisheries Research*, 2023, 45(5): 415–426 [李辰睿, 徐荣亮, 张小旭, 等. 病原哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)TS-628 菌株基因组分析. *渔业研究*, 2023, 45(5): 415–426]
- LI J, LIAO M J, LI B, *et al.* The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during the early developmental stage and its relationship with environmental flora. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 122–131 [李靖, 廖梅杰, 李彬, 等. 养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的菌群特征及其与环境菌群相关性分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 122–131]
- LIU S N, ZHANG B, XIANG D C, *et al.* Effects of *Bacillus velezensis* on growth performance, fecal microbiota and metabolites in pigs. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5622–5635 [刘韶娜, 张斌, 相德才, 等. 贝莱斯芽孢杆菌对猪生长性能、微生物群落和代谢产物的影响. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5622–5635]
- LU Z, YANG Q H, LIN Q, *et al.* Bacterial component analysis of gut of *Apostichopus japonicus* cultured in suspension cage of Fujian. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 9–14 [陆振, 杨求华, 林琪, 等. 福建吊笼养殖仿刺参肠道菌群结构分析. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 9–14]
- MA Y X, XU G R, CHANG Y Q, *et al.* Bacterial pathogens of skin ulceration disease in cultured sea cucumber

- Apostichopus japonicus* (Selenka) juveniles. Journal of Dalian Fisheries University, 2006, 21(1): 13–18 [马悦欣, 徐高蓉, 常亚青, 等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 13–18]
- MULYASARI, SETIJANINGSIH L, SAMSUDIN R, *et al.* The use of local raw materials and fermented feeds for the growth of Giant Prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2022, 1036(1): 012075
- PANG H J, LIAO M J, LI B, *et al.* Etiology and treatment of enteritis disease in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 188–197 [逢慧娟, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗期“肠炎病”及其治疗方法. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 188–197]
- PEI H L, WANG L, TAN B M, *et al.* Environmental factors influence the seasonal characteristics of bacterial community in the sediment of *Apostichopus japonicus* culture ponds. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 89–99 [裴泓霖, 王萃, 谭八梅, 等. 不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构及其影响因素. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 89–99]
- QI R R, TANG S L, CUI L B, *et al.* Histopathological observation of disease of *Rickettsia*-like organism in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(3): 21–24 [戚瑞荣, 唐绍林, 崔龙波, 等. 罗非鱼类立克次氏体病的组织病理学观察. 水产学杂志, 2016, 29(3): 21–24]
- QIAO Y, SHEN H, WAN X H, *et al.* Identification and virulence gene analysis of a pathogenic *Pseudoalteromonas* spp. from *Acanthopagrus schlegel*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(4): 229–233 [乔毅, 沈辉, 万夕和, 等. 1 株黑鲷致病性假交替单胞菌的鉴定及毒力基因分析. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 229–233]
- SEWAKA M, TRULLAS C, CHOTIKO A, *et al.* Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red Tilapia (*Oreochromis* spp.). Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 260–268
- SUN Z, LIU Y M, GAO P C, *et al.* Indicative role of bacterial community structure in aquaculture water on the health of *Litopenaeus vannamei*. Marine Fisheries, 2023, 45(5): 594–604 [孙真, 刘一萌, 高鹏程, 等. 养殖水体细菌菌群结构对凡纳滨对虾健康的指示作用. 海洋渔业, 2023, 45(5): 594–604]
- TAN B M, WANG L, PEI H L, *et al.* The seasonal structural and functional characteristics of bacterial community in *Apostichopus japonicus* culture pond water. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 77–88 [谭八梅, 王萃, 裴泓霖, 等. 不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 77–88]
- WANG L, ZHANG T S, LIU Y, *et al.* High-throughput sequencing analysis of the main pathogens of ulcer diseased *Plectropomus leopardus*. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(3): 617–628 [王磊, 张天时, 刘洋, 等. 高通量测序分析鉴定东星斑溃烂病主要致病菌. 农业生物技术学报, 2023, 31(3): 617–628]
- WANG L L, YANG Q H, LI H Y, *et al.* Isolation and identification of *Photobacterium damsela* causing disease in cultured *Apostichopus japonicus* in Southern China. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(12): 1800–1811 [王丽莉, 杨求华, 李慧耀, 等. 南移仿刺参美人鱼发光杆菌病原分离鉴定与药敏分析. 中国水产科学, 2022, 29(12): 1800–1811]
- WANG J Y, LI B, WANG Y G, *et al.* Influences of immersion bathing in *Bacillus velezensis* DY-6 on growth performance, non-specific immune enzyme activities and gut microbiota of *Apostichopus japonicus*. Journal of Oceanology and Limnology, 2019, 37(4): 1449–1459
- WANG Y G, FANG B, ZHANG C Y, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610–616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610–616]
- WANG Y G, GUO W L, RONG X J, *et al.* Isolation and identification of a pathogenic bacterium associated with off-plate syndrome from *Apostichopus japonicus* cultured in Liaoning Province. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(6): 81–86 [王印庚, 郭伟丽, 荣小军, 等. 养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 81–86]
- WANG Y L, LIN Q, SUN Y H, *et al.* Bacterial flora in sea cucumber culture ponds under different administration methods in autumn. Chinese Journal of Fisheries, 2022, 35(1): 52–58 [王玉龙, 林青, 孙亚慧, 等. 不同管理方式下秋季刺参养殖环境中菌群结构分析. 水产学杂志, 2022, 35(1): 52–58]
- WIBOWO R H, SIPRIYADI, DARWIS W, *et al.* Identification of *Vibrio* spp. causing vibriosis in spiny lobsters (*Panulirus homarus* L.) in Bengkulu marine temporary shelter ponds. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 869(1): 012019
- WU M X, FU X T, LIU Z, *et al.* Cloning and characterization of an alkaline arylsulfatase gene from *Formosa agariphila* and application in desulfation of agar. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(2): 50–59 [吴美娴, 付晓婷, 刘振, 等. 嗜琼胶华美菌芳基硫酸酯酶的克隆表达及在琼胶脱硫中的初步应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(2): 50–59]
- XIA Q, WANG B J, LIU M, *et al.* Pathological changes and transcriptional response to immersion infection by *Vibrio harveyi* in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(10): 1521–1529 [夏青, 王宝杰, 刘梅, 等. 哈维氏弧菌浸浴后凡纳滨对虾肠道组织病

- 理变化及转录水平的免疫应答. 水产学报, 2015, 39(10): 1521–1529]
- XIA Y, LU M X, CHEN G, *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile *Tilapia*, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 368–379
- YACHI S, LOREAU M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1463–1468
- YANG J L, ZHOU L, SHENG X Z, *et al.* Identification and biological characteristics of pathogen RH2 associated with skin ulceration of cultured *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(4): 504–511 [杨嘉龙, 周丽, 绳秀珍, 等. 养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析. 水产学报, 2007, 31(4): 504–511]
- YANG Q H, GE H, FANG L P, *et al.* Identification of *Vibrio tubiashii* isolated from diseased pond-cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(4): 45–51 [杨求华, 葛辉, 方旅平, 等. 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定. 南方水产科学, 2014, 10(4): 45–51]
- YUAN C Y, MENG Y, BI J C, *et al.* Effects of fermented feed on digestive enzyme activities and intestinal microflora of *Penaeus vannamei*. *Feed Industry*, 2018, 39(24): 24–28 [袁春营, 孟阳, 毕建才, 等. 发酵饲料对南美白对虾消化酶活性与肠道菌群的影响. 饲料工业, 2018, 39(24): 24–28]
- ZHANG C Y, WANG Y G, RONG X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123]
- ZHANG X M, ZHANG Y H, LIU M. Analysis of the effects of *Bacillus subtilis* added to feed on the intestinal flora and immune function of *Monopterus albus*. *China Feed*, 2022(2): 70–74 [张新明, 张玉红, 刘明. 饲料中添加芽孢杆菌对黄鳝肠道菌群和免疫功能的影响. 中国饲料, 2022(2): 70–74]
- ZHANG Y Y, HAN Z R, SUN J F, *et al.* Effects of infection with *Shewanella* algae on the microbial communities and expression of related functional genes in the intestine of *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(10): 2300–2307 [张燕玉, 韩卓然, 孙敬锋, 等. 海藻希瓦氏菌感染对半滑舌鳎肠道菌群结构及相关功能基因表达的影响. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2300–2307]
- ZHAO Z L, JIANG J W, PAN Y J, *et al.* Temporal dynamics of bacterial communities in the water and sediments of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture ponds. *Aquaculture*, 2020, 528: 735498
- ZHOU R J, WANG H, WEI D D, *et al.* Bacterial and eukaryotic community interactions might contribute to shrimp culture pond soil ecosystem at different culture stages. *Soil Ecology Letters*, 2022, 4(2): 119–130

(编辑 马瑾艳)

Enteritis in *Apostichopus japonicus* in Cage Culture Areas in the Fujian Dongwuyang Bay: Pathogenic Characteristics and Bacterial Community Structure

WANG Jinjin¹, WANG Yingeng¹, LI Bin¹, RONG Xiaojun¹, LIAO Meijie^{1①},
GE Jianlong¹, HUANG Qiang², WANG Lu³, SHI Guojun⁴

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Xiapu Marine Fishery Development Center, Ningde 355100, China;

3. Qingdao Marine Management Guarantee Center, Qingdao 266071, China;

4. Dongying Municipal Science and Technology Bureau, Dongying 257200, China)

Abstract The sea cucumber industry has developed rapidly over recent year with breeding areas gradually expanding to the southern Fujian region. Using the warm water of the southern sea area during the winter, Fujian Province has exploited *Apostichopus japonicus* cage culture. With <1% of the breeding

① Corresponding author: LIAO Meijie, Email: liaomj@ysfri.ac.cn

area of the nation, Fujian Province produces 18% of the national sea cucumber output, cementing a new paradigm, known as “north sea cucumber and south cultivation,” which has accelerated sea cucumber industry growth substantially. However, with the rapid development of the sea cucumber breeding industry in this area, breeding diseases have become common in recent years, significantly affecting both the survival and weight gain rates associated with breeding. To understand the causes of diseases in this culture mode and explore prevention and control measures, we investigated a sea cucumber enteritis outbreak in the cage cultures of the Dongwuyang Sea, Fujian Province. We analyzed the epidemiological characteristics, pathogenic pathology, environmental microbial groups, and the structure of the intestinal microbiota of sea cucumbers. The intestinal tract of the diseased sea cucumbers were small and contained a large amount of water. The connective tissue and muscle layer were separated, with the connective tissue cells in the sick intestinal tract swollen and partially destroyed, and loosely arranged. Microbial culture data analysis of cultivable bacteria and intestinal and ambient samples from sea cucumbers were conducted. The total quantity and *Vibrio* quantity in the intestinal samples of the diseased sea cucumbers were significantly greater than those in the intestinal samples of healthy sea cucumbers. High-throughput sequencing of the 16S rDNA variable region V3–V4 identified 25 phylums and 311 families. Enterobacteriaceae, Bacillaceae, and Lachnospiraceae represented the top three bacteria families in the healthy group, with relative abundances of 8.69%, 5.53%, and 5.12%, respectively, while Rickettsiaceae, Vibrionaceae, and Enterobacteriaceae represented the top three prominent bacterial families in the diseased group, with relative abundances of 12.66%, 8.22%, and 5.71%, respectively. Vibrionaceae were more prevalent in the diseased group than in the healthy group. The relative abundance of Vibrionaceae was 34.99% and a mixed diet led to the highest environmental sample abundance. Principal co-ordinates analysis (PCoA) and unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analyses indicated that the samples of each group were well grouped, and the microbiota types of the mixed diet were similar to that of the intestinal flora. In conclusion, the intestinal tissue structure of the diseased sea cucumber was changed, and a significant amount of *Vibrio* bacteria in the intestinal tract primarily derived from the mixed diet, which posed a threat to sea cucumber health. Operational taxonomic units (OTUs) with a relative abundance of 0.5% were mainly located in the *Lutimonas*, *Aliivibrio*, and *Formosa* genera. *Vibrio* was mostly pathogenic, while *Formosa* was mostly probiotic. Healthy and diseased gut microbiotas differed significantly in terms of high abundance OTU. These results indicate that the intestinal tissue structure of diseased sea cucumber has changed, and that the large amount of *Vibrio* in the intestine mainly originates from mixed feed. The large microbial community in sea cucumber feed poses a certain threat to their health. The probiotic content of the intestinal tract of healthy sea cucumbers was higher than that of diseased sea cucumbers, and pathogenic bacterial content in diseased sea cucumbers was higher than that of healthy sea cucumbers. Our study findings provide a scientific basis for the development and utilization of potential probiotics and potential pathogenic bacterial screening. Furthermore, our results support sea cucumber bait optimization and offer a theoretical foundation for scientific breeding and disease management.

Key words *Apostichopus japonicus*; Enteritis disease; Mixed feed; Flora structure; High-throughput sequencing