

叶静, 戴文芳, 刘圣, 等. 熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织菌群构成及功能的比较分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(8): 66–77, doi:10.12284/hyxb2022144

Ye Jing, Dai Wenfang, Liu Sheng, et al. Comparison of the composition and functional potentials of bacterial communities in different tissues from *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(8): 66–77, doi:10.12284/hyxb2022144

熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织菌群构成及功能的比较分析

叶静^{1,3}, 戴文芳^{2,3}, 刘圣^{2,3}, 林志华^{2,3}, 薛清刚^{2,3*}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604; 3. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 为探究健康二龄熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎 5 种组织间细菌群落组成、多样性和功能的差异, 本研究利用 Illumina 高通量测序技术和 PICRUSt2 对 3 种牡蛎 5 种组织中的细菌群落构成及其潜在功能进行了比较分析。结果显示, 在 3 种牡蛎的 5 种组织中共鉴定到 6 020 个细菌 OTUs, 其中 3 种牡蛎整体间共有的 OTUs 数占 42.4%。3 种牡蛎 5 种组织中的优势菌主要隶属于 γ -变形菌纲 (γ -proteobacteria)、 α -变形菌纲 (α -proteobacteria)、柔壁菌门 (Tenericutes) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。弧菌属 (*Vibrio*) 在熊本牡蛎的鳃、外套膜、性腺和血淋巴中的相对丰度均显著高于长牡蛎和葡萄牙牡蛎, 且分别在熊本牡蛎外套膜、长牡蛎性腺和葡萄牙牡蛎血淋巴中相对丰度最高, 但均在 3 种牡蛎肝胰腺中相对丰度最低。3 种牡蛎 5 种组织间的菌群多样性均有所差异, 其中在熊本牡蛎鳃、葡萄牙牡蛎外套膜和长牡蛎血淋巴中菌群多样性最高, 而在熊本牡蛎血淋巴、葡萄牙牡蛎性腺和长牡蛎肝胰腺中菌群多样性最低。在不区分组织的情况下, 3 种牡蛎整体间的菌群结构存在显著差异 ($r=0.661$, $p<0.001$)。此外, 在熊本牡蛎肝胰腺、葡萄牙牡蛎鳃和长牡蛎血淋巴中细菌参与的能量代谢相关功能通路的相关丰度显著高于对应牡蛎的其他组织。本文结果表明, 熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织内的菌群构成存在差异, 且由细菌介导的功能也随牡蛎种类和组织类型发生改变。

关键词: 牡蛎; 高通量测序; 细菌群落; 功能预测

中图分类号: Q938.8

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)08-0066-12

1 引言

动物体内定殖着数量庞大且种群构成复杂的微生物。这些微生物与宿主互相依赖、彼此制约, 形成一种相对稳定的共生关系, 从而维持宿主的健康状态^[1-2]。研究表明, 共生微生物在宿主的消化、营养吸收、抗逆和抗菌等方面发挥着重要作用^[3-5]。

牡蛎广泛分布于沿海地区, 是世界范围内养殖最

广、产量最高的经济贝类, 也是我国重要的海水养殖种类之一。同时, 牡蛎在生物多样性保护、净化水体、修复生态系统的功能等方面发挥重要作用^[6]。然而, 受生长环境和滤食习性的影响, 牡蛎体内的共生微生物构成易受到养殖环境的影响, 进而会影响牡蛎的健康状况^[7]。因此, 稳定的细菌群落可能为牡蛎的健康生长提供有利条件。研究表明, 某些益生菌能够降低宿主对疾病的易感性, 这已经在贝类的养殖中

收稿日期: 2021-12-24; 修订日期: 2022-03-22。

基金项目: 国家自然科学基金(32073010, 31672629); 宁波市“泛 3315 计划”现代农业创新团队项目(2019-2023)。

作者简介: 叶静(1995—), 女, 广西壮族自治区钦州市人, 主要从事海洋贝类微生物生态学研究。E-mail: yjing_7758@163.com

* 通信作者: 薛清刚, 教授, 主要从事海水养殖动物疾病及其防控研究。E-mail: qxue@zwwu.edu.cn

得到证实^[8-9]。例如,投喂益生菌短小芽孢杆菌 RI06-95 (*Bacillus pumilus* RI06-95) 可以提高美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 抵抗溶珊瑚弧菌 (*Vibrio coralliilyticus*) 的侵染,从而提高其存活率^[10]。另一方面,牡蛎在养殖过程中易受细菌性疾病的影响。如灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 被证实是导致长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 幼体在育苗期间发生大规模死亡的主要病原菌之一^[11]。此外,牡蛎还可能携带人类致病性细菌,随着人们食用进入人体,从而影响人体的健康。如食用受副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染的贝类是导致食物中毒的主要因素^[12]。因此,探明牡蛎体内细菌群落的构成显得尤为重要。

相比于传统的细菌培养方法, Illumina 高通量测序技术具有通量高、时间短以及能够更全面地反映样间细菌群落的相关信息等优点,已经成为研究微生物组学的重要手段。该技术目前已用于探究鱼类、虾类和贝类等多种水生动物肠道细菌群落组成及其与宿主互作影响宿主健康的微生物生态学机制,进而筛选潜在的益生菌或致病菌^[13-16]。在高通量测序的基础上,利用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 2 工具能够进一步获得细菌群落的功能信息。例如, Zhang 等^[17] 利用 PICRUSt2 工具对肠道细菌群落介导的功能进行分析发现灿烂弧菌感染刺参 (*Apostichopus japonicus*) 时导致其中肠的代谢功能途径的相对丰度显著高于后肠,而中肠中涉及信号分子及其相互作用、外源性生物降解和代谢等的功能途径的相对丰度则均低于后肠,这进一步解释了刺参腐皮综合征先发生于后肠的原因。郁维娜等^[18] 利用 PICRUSt2 分析健康和患病凡纳滨对虾 (*Litopenarus vannamei*) 肠道微生物的代谢功能途径,发现与健康组相比,患病对虾中参与弧菌侵染的过程显著增强,而溶酶体和过氧化物酶等免疫功能代谢过程显著减弱,这些功能途径的丰度变化可能增加了对虾患病的风险。因此,通过 PICRUSt2 可以很好地解释细菌群落与其功能的相关性,这为阐述牡蛎组织菌群构成与菌群功能的相关性提供了有利工具。

熊本牡蛎 (*Crassostrea sikamea*)、葡萄牙牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 和长牡蛎分别是我国浙江、福建和北方沿海地区主要养殖的牡蛎品种。然而,目前对于这三种牡蛎体内的微生物组成及是否携带潜在病原菌并没有全面的认识。此外,这三种牡蛎体内的微生物构成是否因其宿主遗传和养殖环境不同而有差异尚未获知。鉴于此,本研究采用 Illumina 高通量

测序技术对熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎不同组织的细菌群落进行研究,比较分析这三种牡蛎不同组织间的细菌群落组成特征、多样性及功能差异。本研究为整体了解熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织内的细菌群落构成特征以及牡蛎的健康养殖提供了数据支持。

2 材料与方法

2.1 实验设计和样品采集

选取健康的二龄雌性熊本牡蛎(记为 Cs)、葡萄牙牡蛎(记为 Ca)和长牡蛎(记为 Cg)作为实验对象。其中,熊本牡蛎产自浙江省宁波市宁海县西店镇养殖区(海水盐度为 22.7 ± 3.2 、水温为 $(26.2 \pm 2.5)^\circ\text{C}$ 、溶解氧浓度为 $(8.4 \pm 0.2) \text{mg/L}$ 、pH 为 7.7 ± 0.3); 葡萄牙牡蛎产自福建省漳州市漳浦县旧店镇养殖区(海水盐度为 20.5 ± 3.0 、水温为 $(21.3 \pm 4.1)^\circ\text{C}$ 、溶解氧浓度为 $(8.5 \pm 0.5) \text{mg/L}$ 、pH 为 7.4 ± 0.2); 长牡蛎产自山东省青岛市即墨区鳌山卫镇养殖区(海水盐度为 19.5 ± 3.0 、水温为 $(20.3 \pm 2.1)^\circ\text{C}$ 、溶解氧浓度为 $(8.0 \pm 0.5) \text{mg/L}$ 、pH 为 7.5 ± 0.2)。采集的 3 种牡蛎照片如图 1 所示。使用灭菌海水清洗牡蛎外壳,再用酒精进行擦拭,接着用解剖刀在绞合部撬开小口,沿壳缘切开牡蛎两侧闭壳肌,在无菌操作条件下使用 2 mL 注射器从牡蛎围心腔内抽取血淋巴液,置于无菌离心管中,立即于 -80°C 保存。接着使用无菌手术剪刀取牡蛎的鳃、外套膜、肝胰腺和性腺组织,分别置于无菌离心管中。每种牡蛎各取 6 组重复样本。采集的组织样品置于液氮速冻后,于 -80°C 保存,直至 DNA 提取。

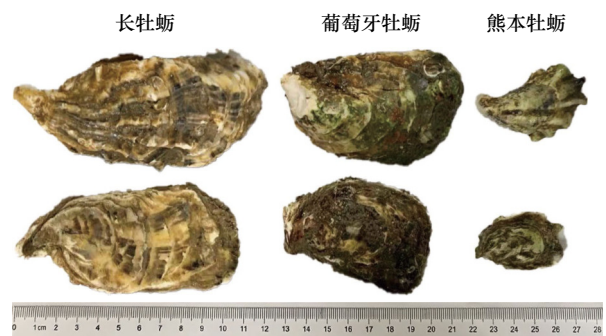


图 1 本研究采集的长牡蛎、葡萄牙牡蛎和熊本牡蛎样品图片

Fig. 1 The pictures of *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea sikamea* collected in this study

2.2 DNA 提取

将收集的组织样本(约 500 mg/样本)分别用匀浆机匀浆后,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(MO

BIO Laboratories, Carlsbad, CA, 美国)按照操作说明书提取 DNA。随后用 NanoDrop ND-2000 分光光度计测定 DNA 浓度。DNA 置于 -20°C 保存备用。

2.3 PCR 扩增和 Illumina 高通量测序

取每个样品纯化后的 40~60 ng gDNA 作为 PCR 扩增模板,使用 16S rRNA 基因引物 338F(5'-ACTCC-TACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R(5'-GGACTACHV-GGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 的 V3-V4 可变区作 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(50 μL)包括 Premix Taq TM 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , gDNA 模板 1 μL 以及 ddH₂O 22 μL 。按照如下程序进行 PCR 反应: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共进行 30 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。每个样品重复 3 次以减少扩增过程造成的偏差。扩增产物用 PCR 片段纯化试剂盒(TaKaRa Biotech, 日本)纯化,使用 Agilent 2100(Agilent, 美国)生物测定仪检测片段大小。每个样品取等量的 PCR 产物,于 Illumina MiSeq 测序平台测序。

2.4 测序数据处理

16S rRNA 基因原始测序数据以 FASTQ 文件形式提交到 Dix-seq 平台分析^[19]。使用 FastQC 对原始测序序列进行质控。利用 FLASH 软件对序列进行拼接^[20], USEARCH 法^[21] 去除嵌合体序列,并利用 MOTHUR 软件将相似性大于 97% 的序列聚类成操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)。随后选取丰度和覆盖度最高的序列作为每个 OTU 的代表序列,用 PyNAST^[22] 在 Silva123 数据库中比对获得物种注释,同时,利用每个样本的相对丰度对特征丰度进行归一化。为了提高数据的可靠性,序列数据分析时删除了古菌、叶绿体、不属于细菌的序列和仅检测到 1 次的序列。各样本的 α -多样性指标和 β -多样性距离均采用 Dix-seq 平台计算。

2.5 功能预测

PICRUSt2 是用来评估预测细菌群落功能通路的重要工具。为了获得细菌群落功能的特征信息,将每个 OTU 的丰度均一化后,利用 PICRUSt2 分析获得 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)细菌群落功能信息,并用热图显示其在不同牡蛎组织间的分布情况。

2.6 统计分析

利用韦恩图比较 3 种牡蛎相同组织间和同种牡蛎不同组织间细菌 OTU 的差异性。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(One-way Variance Analysis, ANOVA)评估 3 种牡蛎相同组织间和同种牡蛎不同

组织间细菌群落 α -多样性和 OTU 数的差异。采用基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度分析(Non-Metric Multidimensional Analysis, NMDS)和相似性分析(Analysis of Similarity, ANOSIM)评估 3 种牡蛎整体间及同种牡蛎 5 种组织间的细菌群落结构差异。在 Rv3.6.3 软件中用基于“vegan”包的多元置换方差分析(Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA)定量评估牡蛎种类和组织类型对细菌群落变化的影响程度。

3 结果

3.1 细菌群落组成特征

原始测序下机序列经过质量控制后共获得了 5 502 202 条优质序列,所得序列经细菌分类数据库比对后归为 6 020 个 OTUs。其中在熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的 5 种组织中分别鉴定到 4 610、4 382 和 3 915 个 OTUs。利用韦恩图比较 3 种牡蛎相同组织间及同种牡蛎不同组织间细菌群落的组成差异。结果表明,熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎整体间共有细菌 OTU 数为 2 554 个(占总 OTU 数的 42.4%),而对应在 3 种牡蛎中特有的 OTU 数分别占总 OTU 数的 11.3%、9.8% 和 7.0%(图 2a)。对 3 种牡蛎相同组织中的细菌进行比较时,发现 5 种组织中的细菌 OTU 数存在差异,其中鳃、肝胰腺、外套膜、性腺和血淋巴中的共有 OTU 数分别占 3 种牡蛎对应相同组织总 OTU 数的 19.8%、11.8%、19.1%、16.3% 和 20.9%。此外,在熊本牡蛎的肝胰腺中细菌的特有 OTU 数最高,占熊本牡蛎所有组织总 OTU 数的 21.6%;而在葡萄牙牡蛎的血淋巴中细菌的特有 OTU 数最多,占葡萄牙牡蛎所有组织总 OTU 数的 12.4%;在长牡蛎外套膜中细菌的特有 OTU 数最多,占长牡蛎所有组织总 OTU 数的 7.2%(图 2b)。这些结果表明,3 种牡蛎整体间及同种牡蛎 5 种组织间细菌的 OTU 数存在显著差异($p < 0.05$)。

在细菌(亚)门水平上,3 种牡蛎组织中的优势菌主要隶属于 γ -变形菌纲(γ -proteobacteria)、柔壁菌门(Tenericutes)和厚壁菌门(Firmicutes)(图 3a)。其中, γ -变形菌纲在熊本牡蛎外套膜中的丰度(平均相对丰度为 86.0%)显著高于其他 4 个组织,而在葡萄牙牡蛎和长牡蛎的血淋巴中丰度最高(平均相对丰度分别为 32.8% 和 39.0%)。柔壁菌门在熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的肝胰腺中的丰度显著高于同种牡蛎中的其他组织,平均相对丰度分别为 25.6%、36.2% 和 22.4%。厚壁菌门在熊本牡蛎的鳃、葡萄牙牡蛎的

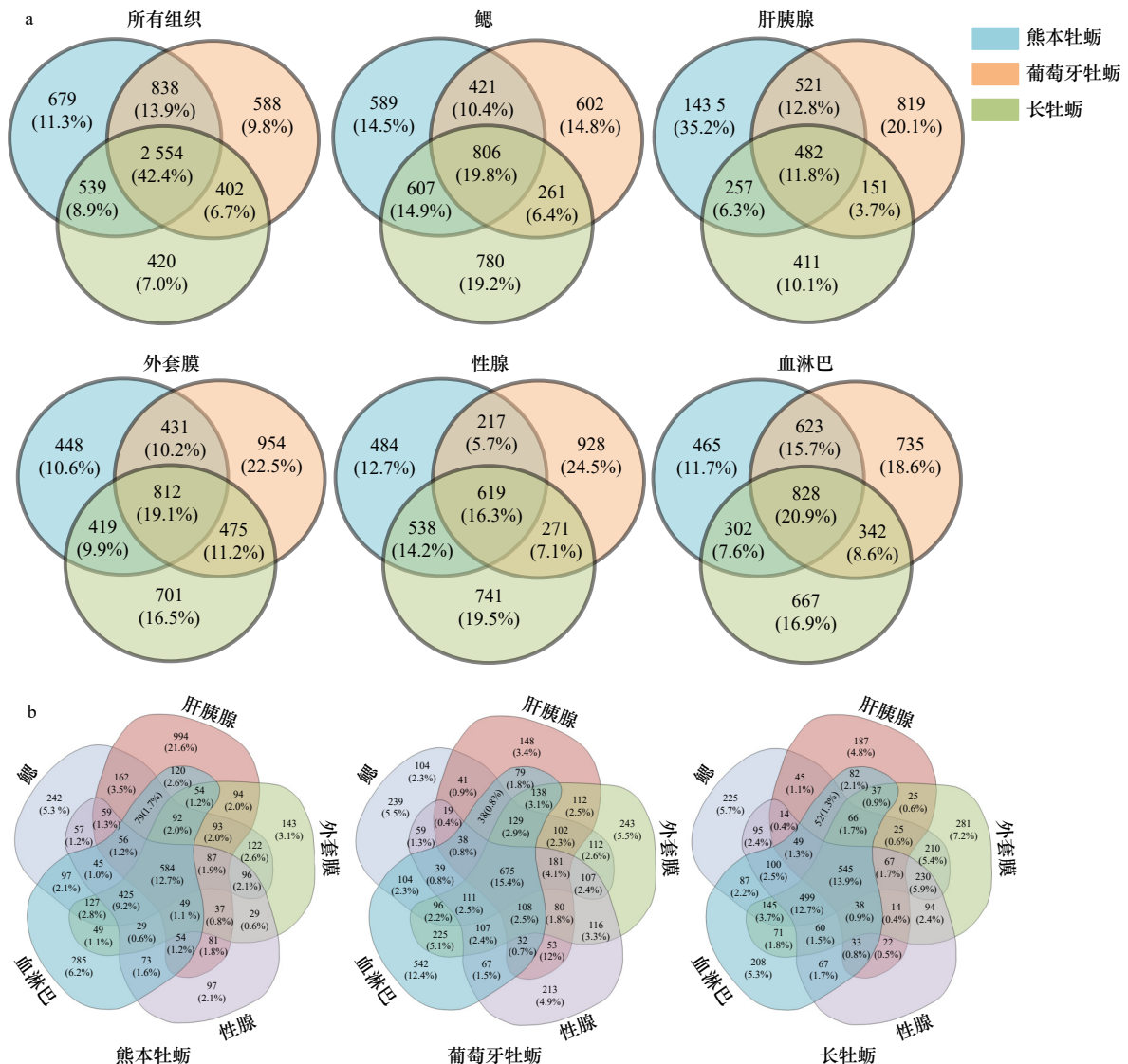


图2 韦恩图展示3种牡蛎相同组织间(a)和同种牡蛎不同组织间(b)共有和特有的细菌OTU数

Fig. 2 Venn diagram displaying the numbers of unique and shared OTU among same tissues from three oysters (a) and different tissues from individual oyster (b)

血淋巴和长牡蛎的肝胰腺中丰度最高,平均相对丰度分别为14.6%、26.7%和37.7%,显著高于对应牡蛎的其他组织($p < 0.05$)。

在细菌属水平上,熊本牡蛎5个组织中的优势菌主要隶属于假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和支原体菌属(*Mycoplasma*);葡萄牙牡蛎5个组织中的优势菌主要隶属于支原体菌属、嗜冷杆菌属和弧菌属;长牡蛎5个组织中的优势菌主要隶属于支原体菌属、假交替单胞菌属、芽胞杆菌属(*Anoxybacillus*)和弧菌属(图3b)。其中,假交替单胞菌属在熊本牡蛎的血淋巴中丰度(平均相对丰度为37.4%)最高,而在其肝胰腺的丰度(平均相对丰度为0.3%)最低。支原体菌属在葡萄牙牡蛎的鳃中丰度(平均相对丰度为36.0%)

最高,且显著高于其他两种牡蛎的5种组织。芽胞杆菌属在长牡蛎的肝胰腺丰度(平均相对丰度为22.4%)最高,且显著高于其他两种牡蛎的5种组织。嗜冷杆菌属在熊本牡蛎和葡萄牙牡蛎的血淋巴中丰度(平均相对丰度分别为17.7%和15.3%)高于对应同种牡蛎的其他4个组织,但均在3种牡蛎的肝胰腺中丰度最低。弧菌属在熊本牡蛎的鳃、外套膜、性腺和血淋巴中的相对丰度均显著高于其在葡萄牙牡蛎和长牡蛎的各个组织中的丰度。其中,对于熊本牡蛎,弧菌属在其外套膜中的丰度显著高于鳃、性腺、肝胰腺和血淋巴中的丰度。就葡萄牙牡蛎来看,弧菌则是在其血淋巴中的丰度最高,而在长牡蛎中弧菌则是在其性腺中丰度最高,但均在3种牡蛎的肝胰腺中丰度最低(图3b)。

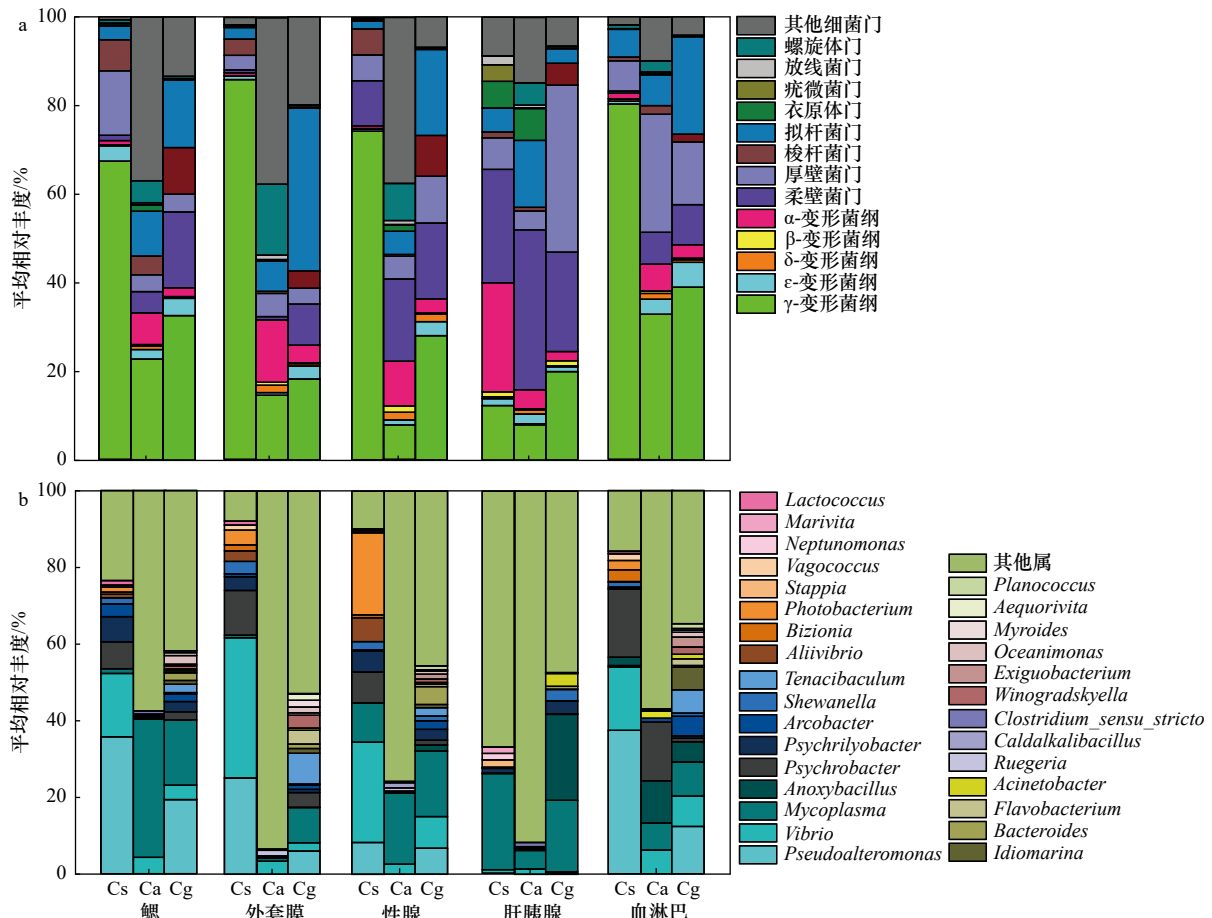


图3 3种牡蛎5种组织中的优势细菌门(变形菌门归类到纲)(a)和细菌属(b)的平均相对丰度
Fig. 3 Average relative abundances of the dominant bacterial phyla (Proteobacteria were assigned to the class level) (a) and genus (b) in the five tissues from three oysters

Cs. 熊本牡蛎; Ca. 葡萄牙牡蛎; Cg. 长牡蛎

Cs. *Crassostrea sikamea*; Ca. *Crassostrea angulata*; Cg. *Crassostrea gigas*

3.2 细菌群落多样性差异

进一步比较熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎5种组织中的细菌群落 α -多样性,多样性指数包括Chao1指数、物种丰富度(Species richness)和香农指数(Shannon index)。结果表明,Chao1指数、物种丰富度指数和香农指数均随牡蛎种类和组织类型的不同而有所差异(图4)。对同种牡蛎不同组织的细菌群落 α -多样性进行比较时,发现Chao1指数和物种丰富度指数在熊本牡蛎的鳃中最高而在血淋巴中最低,在葡萄牙牡蛎的外套膜中最高而在性腺中最低,但在长牡蛎的鳃中最高而在肝胰腺中最低(图4a,图4b)。相反,香农指数在熊本牡蛎的肝胰腺、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的血淋巴中最高,而分别在熊本牡蛎的血淋巴、葡萄牙牡蛎的鳃和长牡蛎的肝胰腺中最低(图4c)。对3种牡蛎的相同组织进行比较时,发现Chao1指数和物种丰富度指数在长牡蛎肝胰腺中的细菌群落多样性显著低于熊本牡蛎和葡萄牙牡蛎;香农指数在葡

萄牙牡蛎的鳃、性腺和肝胰腺中菌群多样性低于熊本牡蛎和长牡蛎,而在熊本牡蛎的血淋巴中细菌群落多样性低于葡萄牙牡蛎和长牡蛎(图4)。这些发现表明,3种牡蛎的相同组织间除外套膜外,细菌群落 α -多样性存在不同程度的差异性。

3.3 细菌群落结构差异

在细菌OTU水平上,利用NMDS分析了3种牡蛎5种组织间的细菌群落结构差异,图中各样品间的相对距离能够反映其菌群的相似程度,距离越近,相似性越高。结果表明,在不区分组织的情况下,熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的菌群结构沿NMDS轴1从左至右明显分离(图5a,图5b);反之,在区分组织情况下,熊本牡蛎和葡萄牙牡蛎5种组织内的菌群结构沿NMDS轴2从下至上明显分离,而长牡蛎5种组织内的菌群结构沿NMDS轴1分离(图5c)。这些结果也进一步通过相似性分析得到证实,表明3种牡蛎5种组织内的细菌群落结构整体存在显著差异(表1)。

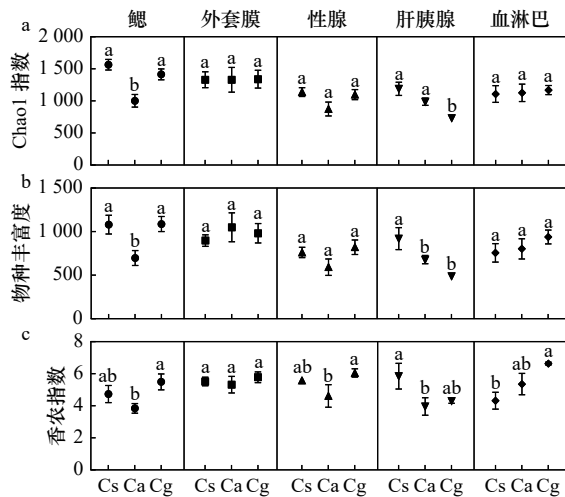


图4 比较3种牡蛎5种组织中的细菌群落 α -多样性差异
Fig. 4 Comparison of bacterial community α -diversity in five tissues from three oysters

Cs. 熊本牡蛎; Ca. 葡萄牙牡蛎; Cg. 长牡蛎; 采用单因素方差分析3种牡蛎种类间在相同组织情况下细菌群落 α -多样性的差异, 不同字母表示3种牡蛎种类具有差异性 ($p < 0.05$)

Cs. *Crassostrea sikamea*; Ca. *Crassostrea angulata*; Cg. *Crassostrea gigas*; the difference of bacterial community α -diversity among three oysters under the same tissue was analyzed by one-way variance analysis, of which showed differences using the different letters ($p < 0.05$)

其中, 熊本牡蛎除了血淋巴、鳃和外套膜样本之间以及葡萄牙牡蛎和长牡蛎除鳃和性腺样本之间的差异不显著外, 同种牡蛎的其他组织样品之间均具有显著差异(表2)。多元置换方差分析结果表明, 牡蛎种类和组织类型分别导致细菌群落发生25.8%和26.6%的变异(表3)。

3.4 细菌群落功能差异

将熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的肝胰腺、鳃和血淋巴中的细菌群落进行功能预测, 并将相关功能途径的丰度分布特征绘制成热图, 结果发现3种牡蛎的鳃、肝胰腺和血淋巴中的菌群功能存在显著差异(图6)。其中由细菌参与的膜转运、复制和修复、信号通路、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、脂质代谢和消化与吸收等功能途径在熊本牡蛎的肝胰腺、葡萄牙牡蛎的肝胰腺和鳃、长牡蛎的血淋巴中丰度显著高于对应牡蛎的其他组织。此外, 参与溶酶体和过氧化氢酶等具有抗菌免疫能力的功能途径在3种牡蛎的鳃、肝胰腺和血淋巴中均具有一定丰度, 而参与碳水化合物消化吸收、胰腺分泌、矿物质吸收和蛋白质消化吸收等消化过程以及细菌性感染疾病的功能过程在3种牡蛎的血淋巴中丰度显著高于其他组织(图6)。这些结果表明, 细菌介导的功能途径在3种牡蛎的不同组织中存在差异。

4 讨论

共生微生物在宿主生理、营养吸收和消化及维持宿主健康等方面具有重要作用^[1, 3-4]。然而, 目前关于探究牡蛎内部整体菌群构成特征的研究甚少。本研究首次对熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎不同组织中的细菌群落结构进行探究, 分析比较3种牡蛎5种组织间细菌群落整体差异。

本研究发现, 熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎中不同组织的细菌OTU数存在显著差异。类似的研究表明, 紫贻贝(*Mytilus edulis*)肠道内的核心细菌OTU数高于美洲牡蛎肠道内的细菌OTU数^[23]。这些发现提示牡蛎组织内的核心菌群可能因其种类不同而有所差异。值得注意的是, 这种差异性在不同分类水平上的细菌组成中也较为明显。例如, 本研究发现熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织中的优势菌门主要隶属于 γ -变形菌纲、柔壁菌门和厚壁菌门, 但其丰度在对应牡蛎的不同组织间存在显著差异。前人研究表明, 这些细菌也是缢蛏内脏团、皱纹盘鲍肠道和美洲牡蛎鳃中的优势菌^[24-26]。这些发现表明, γ -变形菌纲、柔壁菌门和厚壁菌门可能是在贝类中普遍共生的细菌。进一步的研究表明, 这些细菌在水生动物的生长和发育中发挥关键作用^[2, 27]。例如, Semova等^[3]发现厚壁菌(*Firmicutes*)在细胞内脂滴的形成中起着重要作用, 可以促进斑马鱼肠道吸收脂肪。变形菌能够降解纤维素和琼脂, 促进双壳贝类的消化吸收^[28-29]。此外, 本研究也发现假交替单胞菌属、芽胞杆菌属、支原体菌属、嗜冷杆菌属和弧菌属是3种牡蛎5种组织内的优势菌属, 但其丰度在对应牡蛎的不同组织间存在差异。类似的研究发现, 假交替单胞菌属、嗜冷杆菌属和弧菌属是虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和岩扇贝(*Rock scallop*)体内的优势菌属^[15, 30]。研究表明, 假交替单胞菌属能够产生多种具有抗菌活性的化合物^[31]; 芽胞杆菌属可分泌多种胞外酶, 在宿主的食物消化、营养代谢和抵御病原菌入侵中起着重要的作用^[32]; 而支原体菌属有益于缢蛏(*Sin-novacula constricta*)的健康生长^[33]。因此, 这些富集在牡蛎组织中的优势菌属可能在促进牡蛎的生长发育方面发挥了积极作用, 而其具体的生物学功能仍需进一步验证。

近年来, 由弧菌引起的传染性疾病给牡蛎的养殖带来了严重的危害^[34]。弧菌广泛存在于海洋环境中, 是一种条件致病菌, 且极易引起贝类感染弧菌病^[35-38],

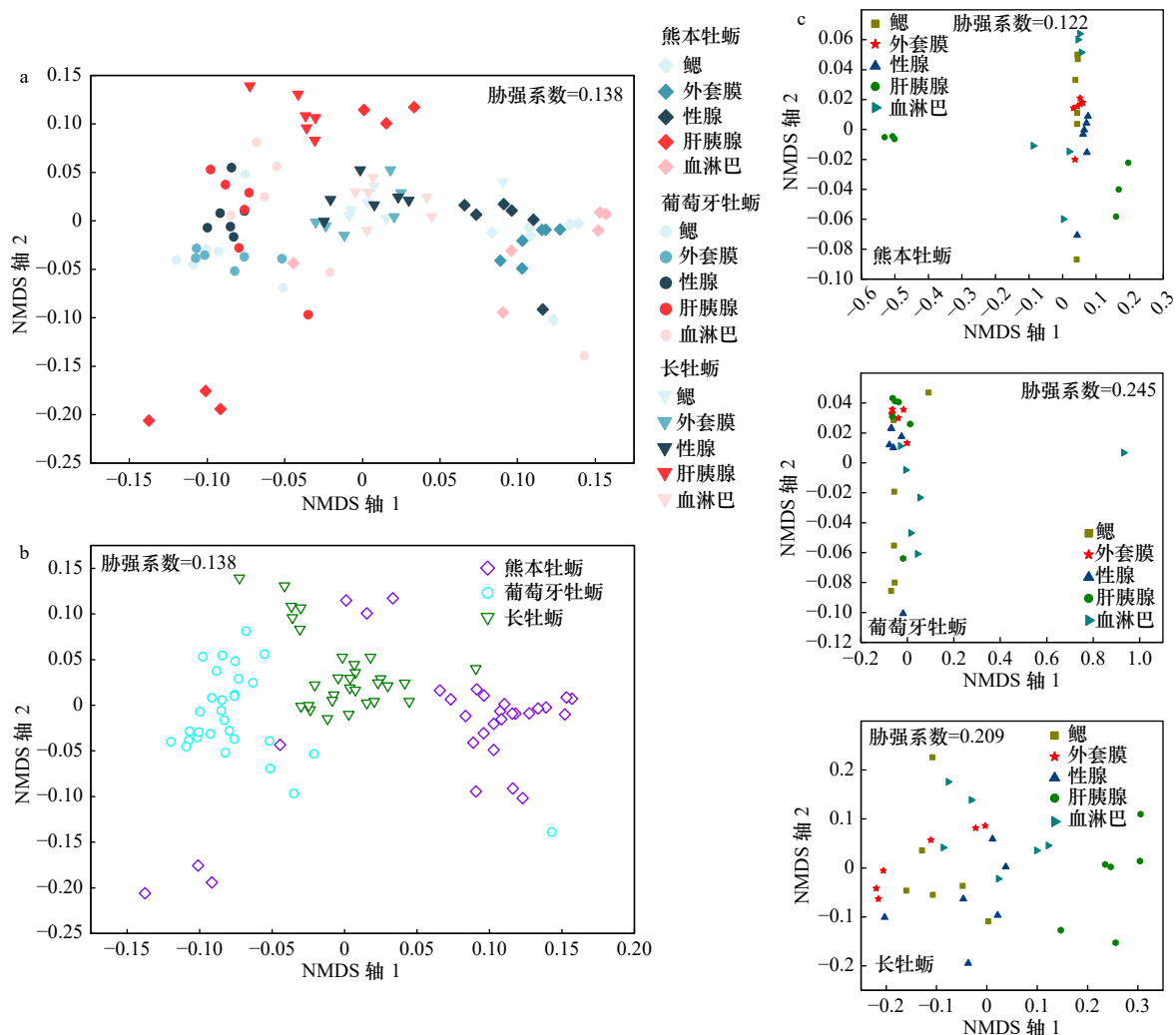


图5 非度量多维尺度分析(NMDS)展示3种牡蛎5种组织间(a)、3种牡蛎整体间(b)和同种牡蛎5种组织间(c)的细菌群落结构差异

Fig. 5 Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) showed the difference in bacterial community structures among five tissues (a), all tissues of three oysters (b), and five tissues of same oyster (c)

严重影响贝类的健康生长,而携带弧菌病原体的牡蛎还可能进一步影响人体的健康^[39]。本研究发现,与葡萄牙牡蛎和长牡蛎相比,弧菌在熊本牡蛎的组织中丰度最高,这提示熊本牡蛎可能在养殖过程中由弧菌引发的疾病风险更高。值得注意的是,弧菌在肝胰腺组织中的丰度显著低于其他组织,这与肝胰腺微生物参与疾病感染的功能途径丰度较低是一致的。然而,在环境适宜时,弧菌会成为优势菌,尤其是在夏季高温季节,极易造成牡蛎死亡^[34]。因此,在牡蛎组织中富集较高丰度的弧菌可能对其后期的养殖起着不容忽视的影响。

本研究发现,这3种牡蛎组织间的细菌群落多样性随着组织不同而存在差异。这可能归因于牡蛎体内微生物间的相互竞争。类似的研究发现,美洲牡蛎的外套膜、鳃和肠道中细菌群落多样性具有高度多

样化特征^[25]。细菌群落多样性有助于维持宿主内环境的稳定^[1-2],高的细菌群落多样性可能是维持宿主健康生长的重要指标。也就是说,细菌群落多样性与宿主的健康状态正相关^[1]。这样看来,在熊本牡蛎中鳃存在高的菌群多样性可能对其健康有一定的指示作用。此外,细菌群落多样性在葡萄牙牡蛎的外套膜中较高,而在长牡蛎的5种组织间也存在不同的变化。这些发现表明,熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织内的细菌群落多样性存在显著差异。类似的研究也发现,同一养殖环境下的美洲牡蛎和紫贻贝间的菌群多样性存在明显不同^[23]。本研究进一步发现,熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎整体组织间存在显著差异,且同种牡蛎的5种组织间也存在不同程度的差异性。已有研究表明,同一亲本繁育的牡蛎苗放在不同的养殖环境中生长,其体内的细菌群落构成会随着

表 1 基于 Bray-Curtis 距离比较 3 种牡蛎不同组织间细菌群落整体差异性

Table 1 Comparison of overall differences in bacterial communities among different tissues of the three oysters based on Bray-Curtis distance

组别	所有组织		鳃		肝胰腺		外套膜		性腺		血淋巴	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
3种牡蛎	0.661	0.001	0.721	0.001	0.580	0.001	0.979	0.001	0.915	0.001	0.478	0.001
Cs vs Ca	0.633	0.001	1.000	0.003	0.283	0.062	1.000	0.003	0.998	0.003	0.437	0.014
Cs vs Cg	0.486	0.001	0.724	0.003	0.435	0.003	1.000	0.003	0.909	0.003	0.543	0.009
Ca vs Cg	0.532	0.001	0.769	0.003	0.885	0.003	0.800	0.003	0.874	0.003	0.572	0.003

注:加粗的数值表示差异显著($p < 0.05$)。

表 2 基于 Bray-Curtis 距离比较同种牡蛎不同组织间细菌群落的差异性

Table 2 Comparison of difference in bacterial communities among different tissues from the same oyster based on Bray-Curtis distance

牡蛎种类	组织类型	鳃	外套膜	性腺	肝胰腺	血淋巴
熊本牡蛎	鳃		0.247	0.465	0.471	0.013
	外套膜	0.014		0.426	0.441	0.148
	性腺	0.003	0.011		0.501	0.38
	肝胰腺	0.003	0.002	0.002		0.462
	血淋巴	0.312	0.071	0.002	0.011	
葡萄牙牡蛎	鳃		0.482	0.057	0.357	0.283
	外套膜	0.004		0.194	0.244	0.445
	性腺	0.220	0.028		0.217	0.383
	肝胰腺	0.025	0.030	0.034		0.4
	血淋巴	0.005	0.005	0.004	0.010	
长牡蛎	鳃		0.413	0.107	0.948	0.53
	外套膜	0.002		0.507	1.000	0.625
	性腺	0.096	0.005		0.967	0.369
	肝胰腺	0.003	0.002	0.002		0.957
	血淋巴	0.002	0.002	0.007	0.003	

注:每个种类的上三角和下三角分别为样本间细菌群落差异性的 *R*值和 *p*值;加粗的数值表示差异显著($p < 0.05$)。

宿主生长差异越来越明显^[40],类似的结果也在海参肠道微生物研究中被发现^[41],这表明养殖环境可能是影响细菌群落构成的原因。Fernández 等^[42]研究发现,生长在同一养殖环境下的长牡蛎和美洲牡蛎体内的细菌群落也存在差异,这表明宿主遗传也可能是影响细菌群落构成的原因。值得注意的是,本研究的实验对象是 3 种不同的牡蛎,且分别采自 3 个不同的省份,

表 3 基于非参数的多元置换方差分析牡蛎种类和组织类型对细菌群落的定量影响

Table 3 Quantitative effects of oyster species and tissue types on the variations in bacterial community based on nonparametric permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)

	自由度	平方和	均方差	<i>F</i> 模型	<i>R</i> ²	<i>p</i>
牡蛎种类	2	6.888	3.444	20.283	0.258	0.001
组织类型	12	7.117	0.593	3.493	0.266	0.001
残差	75	12.735	0.170	-	0.476	-
总计	89	26.741	-	-	1	-

注:加粗的数值表示差异显著($p < 0.05$);-代表无数值。

其养殖水质存在一定的差异。特别是牡蛎长期生活在海水环境中,水体中的微生物可能会影响牡蛎体内的微生物构成^[7]。由此看来,宿主遗传和养殖环境可能是导致 3 种牡蛎组织内细菌群落构成差异的原因,但其各自对菌群的贡献程度仍需进一步的验证。

共生微生物在宿主中执行着不同的功能,而宿主内稳态的失衡可能影响微生物的功能潜力,进而影响宿主的健康状况^[17-18]。鉴于此,本研究进一步比较了熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎不同组织的细菌群落功能。结果发现,参与氨基酸代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢以及消化和吸收的功能途径均在牡蛎的肝胰腺中丰度较高。肝胰腺是牡蛎重要的消化器官^[43],较高丰度的功能途径表明微生物可能在牡蛎的营养吸收方面起着重要作用。此外,溶酶体和过氧化物酶等具有抗菌免疫能力的功能途径在熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎的鳃、肝胰腺和血淋巴中具有 一定丰度。这些发现表明,在抵抗外界菌群的入侵时,牡蛎的各种组织共同协助,从而维持宿主体内稳定的微生态环境。值得注意的是,细菌性感染疾病主要在牡蛎的血淋巴中富集,这提示血淋巴中的微生物

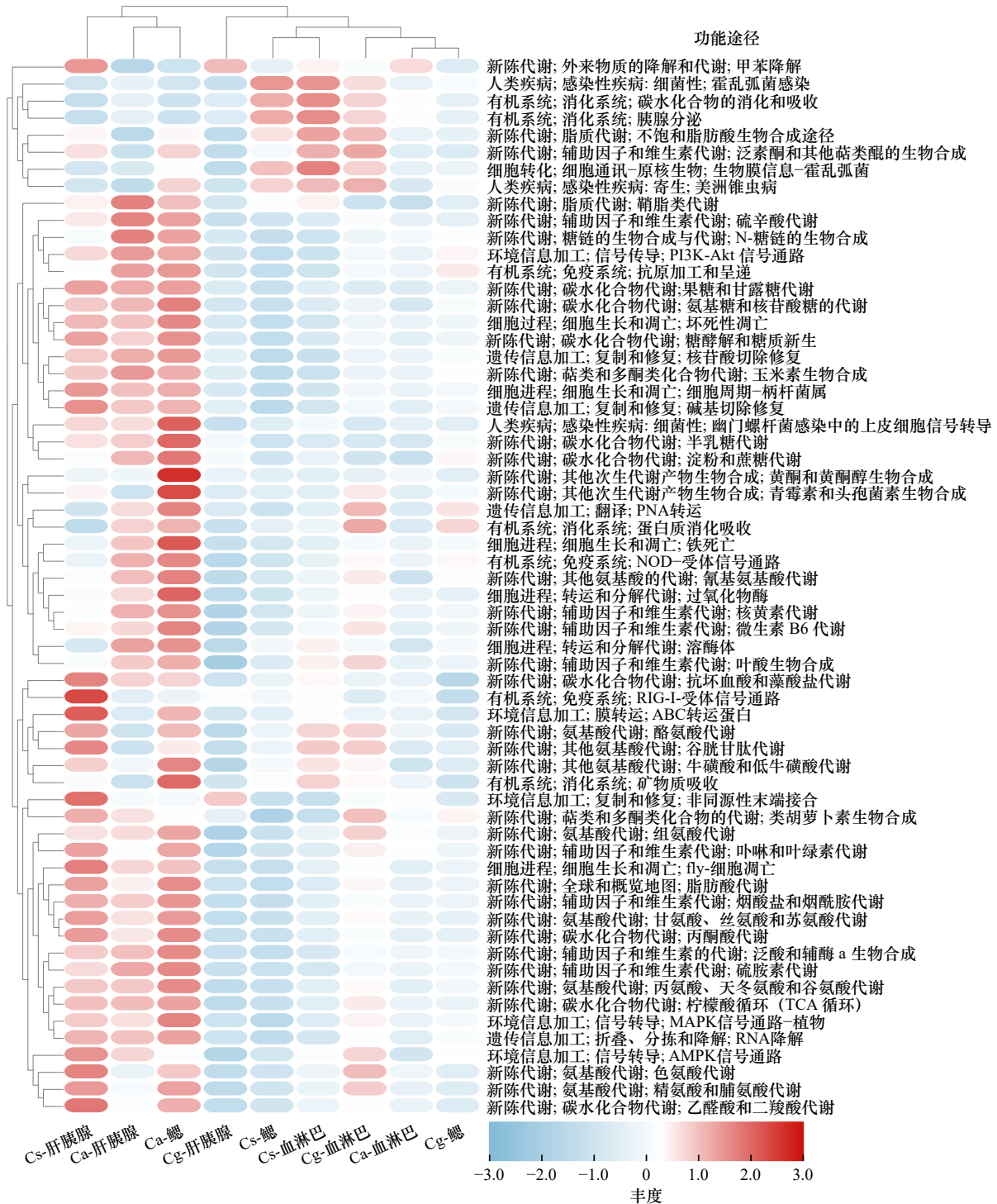


图 6 热图展示 3 种牡蛎的肝胰腺、鳃、血淋巴中细菌群落功能途径的丰度(平方根转换)分布

Fig. 6 Heatmap showing the abundance (sqrt(x) transformed) distribution of functional pathways of bacterial communities in the gill, hepatopancreas, and hemolymph from three oysters

Cs. 熊本牡蛎; Ca. 葡萄牙牡蛎; Cg. 长牡蛎

Cs. *Crassostrea sikamea*; Ca. *Crassostrea angulata*; Cg. *Crassostrea gigas*

可能在宿主的免疫防御中起着重要作用^[1,4]。综上所述, 3 种牡蛎不同组织中的微生物可以影响其不同功能, 在维持牡蛎生长、抗菌和营养吸收等方面起着关键的作用。

5 结论

熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎 5 种组织中的细菌群落结构整体存在显著差异, 而细菌群落 α -多样性

和群落组成在同种牡蛎的5种组织间和3种牡蛎相同组织间也存在不同程度的差异性,这些发现提示宿主遗传和养殖环境可能是导致3种牡蛎组织内菌群构成差异的主要原因,但哪个是决定性因素还有待进一步实验验证。假交替单胞菌属、芽胞杆菌属和支原体菌属在3种牡蛎组织中的丰度分布情况与其对应的生物学功能相一致,可能作为益生菌促进牡蛎健康生长。值得注意的是,弧菌属在3种牡蛎5种组织中存在不同程度的丰度分布,特别是在熊本牡蛎外套膜、葡萄牙牡蛎血淋巴和长牡蛎性腺中丰度分布最高,可能作为潜在病原菌影响后期牡蛎生长。然而,由于目前16S注释数据库信息有限,无法获得细菌种水平上的分类信息,因此不能确定哪些弧菌菌株以及这些

弧菌属中是否存在人的潜在致病菌,建议在今后的研究中利用宏基因组手段进一步明确3种牡蛎组织中弧菌属在种水平上的构成特征及其基因功能组成。在熊本牡蛎肝胰腺、葡萄牙牡蛎鳃和长牡蛎血淋巴中由菌群介导的代谢功能途径如氨基酸、碳水化合物和脂质的代谢等丰度显著高于对应牡蛎的其他组织,提示微生物在促进宿主营养吸收方面发挥着重要作用且具有一定的组织特异性。特别是参与细菌性感染疾病过程的功能通路主要在3种牡蛎的血淋巴中富集,表明微生物可能在宿主的免疫防御中起着重要作用。本研究丰富了我们对于熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎和长牡蛎组织内细菌群落构成特征的认识,这也为利用微生物调控牡蛎生长,促进牡蛎的健康养殖提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Clerissi C, de Lorgeril J, Petton B, et al. Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters[J]. *BioRxiv*, 2018, doi: 10.1101/378125.
- [2] Wang Yanting, Wang Kai, Huang Lei, et al. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 106.
- [3] Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(3): 277–288.
- [4] Modak T H, Gomez-Chiarri M. Contrasting immunomodulatory effects of probiotic and pathogenic bacteria on eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 588.
- [5] Kesarcodei-Watson A, Miner P, Nicolas J L, et al. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 344–349: 29–34.
- [6] 全为民, 张锦平, 平仙隐, 等. 巨牡蛎对长江口环境的净化功能及其生态服务价值[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(4): 871–876.
Quan Weimin, Zhang Jinping, Ping Xianyin, et al. Purification function and ecological services value of *Crassostrea* sp. in Yangtze River Estuary[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(4): 871–876.
- [7] Lokmer A, Kuenzel S, Baines J F, et al. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 970–987.
- [8] Sohn S, Lundgren K M, Tammi K, et al. Probiotic strains for disease management in hatchery larviculture of the eastern oyster *Crassostrea virginica*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2016, 35(2): 307–317.
- [9] Ruiz-Ponte C, Samain J F, Sánchez J L, et al. The benefit of a *roseobacter* species on the survival of scallop larvae[J]. *Marine Biotechnology*, 1999, 1(1): 52–59.
- [10] Stevick R J, Sohn S, Modak T H, et al. Bacterial community dynamics in an oyster hatchery in response to probiotic treatment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1060.
- [11] Dubert J, Barja J L, Romalde J L. New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 762.
- [12] 江海洋, 李磊, 莫宝庆, 等. 贝类污染副溶血性弧菌与海水水质相关性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(12): 2502–2504.
Jiang Haiyang, Li Lei, Mo Baoqing, et al. Relationship between *Vibrio parahaemolyticus* concentration in shellfish and sea water quality[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(12): 2502–2504.
- [13] Larsen A M, Mohammed H H, Arias C R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(6): 1396–1404.
- [14] Zhang Xuechen, Li Xiaohui, Lu Jiaqi, et al. Quantifying the importance of external and internal sources to the gut microbiota in juvenile and adult shrimp[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735910.
- [15] 孙雪莹. 虾夷扇贝幼体及育苗池水体细菌群落动态及潜在益生菌筛选[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
Sun Xueying. Dynamics of bacterial communities associated with yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) larvae and in the water of larval-rearing tanks, and selection of potential probiotics[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016.
- [16] 陈琼, 李贵阳, 罗坤, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)亲虾繁殖期水体微生物多样性[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(1): 130–138.
Chen Qiong, Li Guiyang, Luo Kun, et al. Microbial diversity in broodstock waters of the two genders of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 130–138.
- [17] Zhang Zhen, Lu Zhimeng, Zhang Weiwei, et al. Comparative analysis of midgut bacterial community under *Vibrio splendidus* infection

- in *Apostichopus japonicus* with hindgut as a reference[J]. *Aquaculture*, 2019, 513: 734427.
- [18] 郁维娜, 戴文芳, 陶霞, 等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 399–409.
Yu Weina, Dai Wenfang, Tao Zhen, et al. Characterizing the compositional and functional structures of intestinal microflora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 399–409.
- [19] Wei Yongjun, Ren Tianqi, Zhang Lei. Dix-seq: an integrated pipeline for fast amplicon data analysis[J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.05.11.089748.
- [20] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [21] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [22] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266–267.
- [23] Pierce M L, Ward J E. Gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the blue mussel (*Mytilus edulis*): temporal variation and the influence of marine aggregate-associated microbial communities[J]. *mSphere*, 2019, 4(6): e00730–19.
- [24] 王鑫毅, 谢晓, 金珊, 等. 基于高通量测序的缢蛏及其养殖池塘菌群结构的季节变化[J]. 应用生态学报, 2019, 30(12): 4267–4276.
Wang Xinyi, Xie Xiao, Jin Shan, et al. Seasonal variation of microflora in *Sinonovacula constricta* and its aquacultural pond based on high-throughput sequencing[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(12): 4267–4276.
- [25] Pimentel Z T, Dufault-Thompson K, Russo K T, et al. Microbiome analysis reveals diversity and function of *mollicutes* associated with the eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. *mSphere*, 2021, 6(3): e00227–21.
- [26] Tanaka R, Ootsubo M, Sawabe T, et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques[J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1/4): 453–463.
- [27] 徐嘉康, 王劲松, 方怡涵, 等. 厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响[J]. 海洋学报, 2021, 43(9): 81–91.
Xu Jiakang, Wang Jinsong, Fang Yihan, et al. Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(9): 81–91.
- [28] Karimi E, Keller-Costa T, Slaby B M, et al. Genomic blueprints of sponge-prokaryote symbiosis are shared by low abundant and cultivatable *Alphaproteobacteria*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1999.
- [29] 李玲玲, 谢超伊, 宋宏策, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)黑色壳表面微生物多样性的研究[J]. 海洋与湖泊, 2021, 52(6): 1418–1429.
Li Lingling, Xie Chaoyi, Song Hongce, et al. Microbial diversity on surface of black-shell *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(6): 1418–1429.
- [30] 邹建威. 岩扇贝内脏团和肠道可培养微生物及其宏基因组多样性分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
Zou Jianwei. Diversity analysis of culturable microorganisms and their macrogenes in rock scallop viscera and intestine[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019.
- [31] Wang Hailiang, Sun Bochao, Xie Guosi, et al. Spotlight on a novel bactericidal mechanism and a novel SXT/R391-like integrative and conjugative element, carrying multiple antibiotic resistance genes, in *Pseudoalteromonas flavipulchra* strain CDM8[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126598.
- [32] Bairagi A, Ghosh K S, Sen S K, et al. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(5): 436–446.
- [33] Dai Wenfang, Dong Yinghui, Ye Jing, et al. Gut microbiome composition likely affects the growth of razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737847.
- [34] Gradoville M R, Crump B C, Häse C C, et al. Environmental controls of oyster-pathogenic *Vibrio* spp. in oregon estuaries and a shellfish hatchery[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(9): e02156–17.
- [35] Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde J L, et al. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 34–43.
- [36] Le Roux F, Wegner K M, Polz M F. Oysters and vibrios as a model for disease dynamics in wild animals[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(7): 568–580.
- [37] 郑国兴, 李何, 黄宇宇, 等. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 85–95.
Zheng Guoxing, Li He, Huang Ningyu, et al. Characteristics of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased clam *Meretrix meretrix* and histopathological observations on diseased clam by electron microscope[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1991, 15(2): 85–95.
- [38] 高晓建, 姚东瑞, 孙晶晶, 等. 4株长牡蛎(*Crassostrea gigas*)致病性哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)鉴定及其毒力基因检测[J]. 海洋湖沼通报, 2015(3): 87–96.
Gao Xiaojian, Yao Dongrui, Sun Jingjing, et al. Identification of 4 pathogenic *Vibrio harveyi* strains isolated from diseased oyster (*Crassostrea gigas*) and detection of their virulence genes[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 87–96.
- [39] 胡慧雯. 浙江省贝类海产品副溶血弧菌污染的风险识别与评估[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
Hu Huiwen. Risk identification and assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish seafood in Zhejiang[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.

- [40] Arfken A, Song B, Allen Jr S K, et al. Comparing larval microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) raised in different hatcheries[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735955.
- [41] 柴英辉, 高菲, 王金锋, 等. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道菌群的地域性差异与共性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(5): 1127–1137.
Chai Yinghui, Gao Fei, Wang Jinfeng, et al. Intestinal microbiota in *Apostichopus japonicus*: regional difference and common feature[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1127–1137.
- [42] Fernández N T, Mazón-Suástegui J M, Vázquez-Juárez R, et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(1): 69–83.
- [43] 张令帅. 海洋酸化对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)肝胰腺生理功能和能量供给策略的影响[D]. 北京: 中国科学院海洋研究所, 2020.
Zhang Lingshuai. Impact of ocean acidification on hepatopancreas physiological function and energy supply of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[D]. Beijing: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020.

Comparison of the composition and functional potentials of bacterial communities in different tissues from *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*

Ye Jing^{1,3}, Dai Wenfang^{2,3}, Liu Sheng^{2,3}, Lin Zhihua^{2,3}, Xue Qinggang^{2,3}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Ninghai Institute of Mariculture Breeding and Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ninghai 315604, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource, College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: To explore the differences in the composition, diversity, and functions of bacterial communities in tissues from two-year old and healthy *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*, the bacterial community structures and functional potentials among three oysters by combining the Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology and phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states 2 (PICRUSt2) was compared in this paper. The results showed that a total of 6 020 OTUs were identified in the five tissues from the three oysters, among which the numbers of shared OTUs accounted for 42.4% of total OTUs. The γ -proteobacteria, α -proteobacteria, Tenericutes and Firmicutes were dominant in five tissues of three oysters. The relative abundance of *Vibrio* genus was significantly higher in the gill, mantle, hepatopancreas and hemolymph tissues of *C. sikamea* than in the five tissues of *C. angulata* and *C. gigas*. Compared to other tissues, the relative abundance of *Vibrio* genus was the highest in the mantle of *C. sikamea*, the gonad of *C. angulata* and the hemolymph of *C. gigas*, but was lowest in the hepatopancreas of all three oysters. The diversity of bacterial communities was different among the five tissues of three oysters. Compared to other tissues, the bacterial community α -diversity was higher in the gill of *C. sikamea*, the mantle of *C. angulata* and the hemolymph of *C. gigas*, respectively, but was lowest in the hemolymph of *C. sikamea*, the gonad of *C. angulata* and the hepatopancreas of *C. gigas*. Regardless of tissue types, the bacterial community structures differed significantly ($r=0.661$, $p<0.001$) among the three oysters. Additionally, the abundances of bacterial-mediated functional pathways involved in the energy metabolism were significantly higher in the hepatopancreas of *C. sikamea*, the gill of *C. angulata* and the hemolymph of *C. gigas* than that in other tissues of corresponding oysters. Our findings suggested that the structure and composition of bacterial communities were different among five tissues of *C. sikamea*, *C. angulata* and *C. gigas*, and the bacterial-mediated functional potentials were affected by oyster species and tissue types.

Key words: oyster; high-throughput sequencing; bacterial community; function prediction