



# 基于宏基因组测序技术揭示大泷六线鱼肠道微生物特征

樊英<sup>1</sup>, 王友红<sup>1</sup>, 姬广磊<sup>2</sup>, 许拉<sup>1</sup>, 王淑娴<sup>1</sup>, 胡发文<sup>1</sup>, 刁菁<sup>1</sup>, 姜景腾<sup>2</sup>, 叶海斌<sup>1\*</sup>

- 1 山东省海洋科学研究院 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东 青岛 266104
- 2 威海市海洋发展研究院, 山东 威海 264200

樊英, 王友红, 姬广磊, 许拉, 王淑娴, 胡发文, 刁菁, 姜景腾, 叶海斌. 基于宏基因组测序技术揭示大泷六线鱼肠道微生物特征[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 357-375.

FAN Ying, WANG Youhong, JI Guanglei, XU La, WANG Shuxian, HU Fawen, DIAO Jing, JIANG Jingteng, YE Haibin. Metagenomic sequencing reveals the intestinal microbial characteristics of *Hexagrammos otakii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 357-375.

**摘要:** 对大泷六线鱼不同生长期肠道微生物进行分析。【目的】基于宏基因组学技术揭示其肠道微生物变化特征及其与营养的联系。【方法】对大泷六线鱼仔鱼、稚鱼和幼鱼肠道微生物样本进行HiSeq高通量测序,分析菌群结构,比较微生物群落的多样性,探究生长过程中肠道微生物的相互演替及功能关系。【结果】门水平上,鱼肠道微生物在生长过程中优势菌门变形菌门(*Proteobacteria*)递减,而厚壁菌门(*Firmicutes*)递增;属水平上,仔鱼期的弧菌属(*Vibrio*) (37.8%)、稚鱼期的发光杆菌属(*Photobacterium*) (77.8%)、幼鱼期的乳酸菌属(*Lactococcus*) (42.5%)占优势,微生物群落组成发生显著变化;且仔鱼期的多样性高,幼鱼期的丰富度高;物种差异也呈现着与生长特征的相关性,幼鱼期差异标志物是厚壁菌门、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、乳酸杆菌目(*Lactobacillales*)、链球菌科(*Streptococcaceae*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*);稚鱼期差异标志物是发光杆菌属、托鲁尼发光菌(*Photobacterium toruni*);仔鱼期差异标志物是 *Phaeobacter inhibens*、*Colwellia aestuarii* 和 *Colwellia polaris* 等。宏基因组功能水平分析显示,KEGG 数据统计代谢功能占优势,随生长呈现递增趋势,鱼肠道微生物群在碳水化合物代谢、氨

资助项目: 山东省鱼类产业技术体系(SDAIT-12)

This work was supported by the Shandong Province Technical Innovation Team of Fish (SDAIT-12).

\*Corresponding author. Tel: +86-532-89016594, E-mail: yehaibin@263.net

Received: 2022-05-05; Accepted: 2022-06-24; Published online: 2022-07-14

基酸代谢、核苷酸代谢、能量代谢，以及辅助因子和维生素代谢中起着重要作用；从蛋白注释功能上也呈现了类似的结果，碳水化合物代谢(3 350)和氨基酸代谢(2 424)占代谢通路主要组成部分。功能差异分析表明，随着生长变化，微生物功能逐渐适应机体和环境需求，稚鱼期差异主要体现在能量代谢和糖降解功能；仔鱼期差异显著的是细胞的生长、死亡和凋亡功能，主要体现在光合作用方面；幼鱼期主要体现是二级代谢物的生物合成，其次是糖酵解和糖异生等碳水化合物代谢等。【结论】大泷六线鱼仔、稚、幼不同生长期肠道微生物结构存在显著差异，生长发育改变肠道微生物菌群的功能，采用差异物种和差异功能综合判定生长所需的营养，有助于提高养殖效益，为绿色健康生态养殖提供理论基础。

关键词：宏基因组学；大泷六线鱼；肠道微生物；物种差异；功能差异

## Metagenomic sequencing reveals the intestinal microbial characteristics of *Hexagrammos otakii*

FAN Ying<sup>1</sup>, WANG Youhong<sup>1</sup>, JI Guanglei<sup>2</sup>, XU La<sup>1</sup>, WANG Shuxian<sup>1</sup>, HU Fawen<sup>1</sup>, DIAO Jing<sup>1</sup>, JIANG Jingteng<sup>2</sup>, YE Haibin<sup>1\*</sup>

1 Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Municipal Engineering Research Center of Aquatic Biological Quality Evaluation and Application, Marine Science Research Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, Shandong, China

2 Weihai Marine Development Research Institute, Weihai 264200, Shandong, China

**Abstract:** The intestinal microorganisms in *Hexagrammos otakii* at different growth stages are analyzed. **[Objective]** We investigated the changes of intestinal microorganisms in *H. otakii* and the relationship with the nutrition via metagenomics. **[Methods]** HiSeq sequencing of the intestinal microbial samples from larvae, juveniles, and young fishes was carried out to analyze the changes in community composition, compare the diversity of microbial community, and explore the interactions between microorganisms and functional relationship in the growth. **[Results]** The abundance of the dominant *Proteobacteria* in the intestine of fish decreased, while that of the dominant *Firmicutes* increased. The dominant genus was *Vibrio* at larval stage (37.8%), *Photobacterium* at juvenile stage (77.8%), and *Lactococcus* at young fish stage (42.5%), suggesting the significant variation of community composition in the growth period. Moreover, the microbial diversity was high at the larval stage and the richness was high at the juvenile stage. Species difference was correlated with the growth. Specifically, at the young fish stage, the differential taxa were *Firmicutes*, *Bacilli*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillales*, *Lactococcus* and *Lactococcus lactis*. As for the juvenile stage, the biomarkers were *Photobacterium* and *Photobacterium toroni*. At the larval stage, the biomarkers were *Phaeobacter inhibens*, *Colwellia aestuarii*, *C. polaris*, etc. The microbes were mainly involved in the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway of metabolism and the

abundance of this function rose with the growth. To be specific, the intestinal microbiota played an important role in carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, nucleoside acid metabolism, energy metabolism, co-factor and vitamin metabolism. Similar results were also presented in terms of protein annotation, which showed that carbohydrate metabolism (3 350) and amino acid metabolism (2 424) dominated the metabolic pathways. The analysis of functional differences demonstrated that microbial functions gradually adapted to the needs of the fish body and environment during the growth. The differential functions were energy metabolism and glucose degradation at the juvenile stage, and the cell growth, death, and apoptosis at the larval stage (mainly in photosynthesis). As for the young fish stage, the major differential function was the biosynthesis of secondary metabolites, followed by carbohydrate metabolism such as glycolysis and gluconeogenesis. **[Conclusion]** The intestinal microbial structure of *H. otakii* was significantly different among the larvae, juveniles and young fishes. The functions of the intestinal microbiota changed with the growth and development of the fish. The nutrients for the growth of the fish can be determined based on the differential species and differential functions. This study is expected to improve the breeding efficiency of this fish and lay a theoretical basis for ecological breeding.

**Keywords:** metagenomics; *Hexagrammos otakii*; intestinal microorganisms; species difference; function difference

在脊椎动物中, 肠道有一个复杂的生态系统, 由大量、多样和动态的微生物聚集而成<sup>[1]</sup>。参与生命运转、与宿主共同进化后, 肠道微生物群被视为宿主的一个重要组成部分, 是宿主生长发育的关键因素<sup>[2]</sup>。研究表明, 肠道微生物在宿主不同发育阶段、不同营养水平和不同环境条件下通过协作/竞争形成复杂而紧密的关系网络, 参与宿主的营养获得及免疫调控, 维持正常肠道功能和宿主体内生态平衡, 从而应对内源、外源因素的改变<sup>[3-6]</sup>。

选择不同的方法探索肠道微生物的组成和功能是一个关键部分。传统的培养方法历来被视为研究肠道微生物组成的基础, 但受人为因素或客观条件的限制, 此方法仅适用于可培养的微生物, 且不能完全反映宿主肠道微生物群的多样性和物种结构。然而, 基因测序技术的不断创新和应用为高通量测序带来了机会。得益于宏基因组学技术的飞速发展, 我们已经有

能力较为全面地分析微生物群落各方面的特性, 获取群落的组成结构, 掌握其多样性变化规律, 并揭示其中的优势物种, 通过鸟枪法测序技术(shotgun sequencing), 结合全微生物组关联分析(microbiome wide association studies, MWAS)策略, 从原理上阐明微生物群落在生命系统中发挥作用的根本机制, 从而深入探讨它们对于整个生态系统及其生命的重要意义。

大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*), 隶属于鲷形目 (*Scorpaeniformes*)、六线鱼科 (*Hexagrammidae*)、六线鱼属(*Hexagrammos*), 又名黄鱼、黄棒子, 栖息于大陆和岛屿沿岸水深 50 m 之内的岩礁附近水域底层, 食性杂, 喜集群, 游泳能力较弱。在北太平洋西部海域, 鄂霍次克海南部海域(太平洋西北部沿海), 日本海以及我国黄海海域均有分布, 是一种具有广泛前景的经济养殖鱼类<sup>[7]</sup>。本研究中, 采集大泷六线鱼不同生长阶段的肠道微生物样品, 通过

宏基因组技术对测序原始数据处理后,经不同方法分析微生物群落特征及其影响,为后续相关研究奠定基础,对大泷六线鱼养殖业的可持续发展尤为重要。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验设计

本实验所需大泷六线鱼来自山东威海圣航水产有限公司,游动活泼,体色光亮,食欲旺盛,未发现病症,养殖过程处于常规工厂化环境(水温 16.0 °C,盐度 31‰,pH 8.0)。实验中共设 3 个平行组(车间),每个平行组设 3 个养殖池,在正常生长周期 8 日龄(仔鱼期:主要摄食轮虫)、40 日龄(稚鱼期:主要摄食卤虫无节幼体,后稚鱼期混合少许配合饲料)、80 日龄(幼鱼期:主要摄食配合饲料,来自北京汉业科技有限公司)3 个阶段分别进行取样(命名为 O1, O2, O3)。采样前停止进食 24 h,从每个平行组中随机抽取 30 条鱼(每个养殖池 10 条),混合并作为一个样本进行分析,以减少个体差异的影响。

### 1.2 样品采集

将无菌控制台放在冰上进行样品采集处理。用 75%酒精消毒鱼的肛门及周围表皮,用无菌解剖剪刀将肛门上下划成弧形,取出肠道;然后,用 75%酒精消毒肠道组织表面,用无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)缓冲液冲洗 3 次,无菌棉球擦拭和干燥后将整个肠道放入无菌 Eppendorf 管中,迅速置于液氮中,或将其储存在-80 °C,备用。

### 1.3 基因组 DNA 提取

使用 E.Z.N.A.粪便 DNA 试剂盒(D4015-02, Omega, Inc.)从不同样本中提取 DNA。按照说明书进行操作,总 DNA 利用 50 μL 洗脱缓冲液洗脱,并储存在-80 °C,备测。

### 1.4 测序

基于 Illumina NovaSeq/HiSeq 高通量测序平台,采用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略,将提取获得的菌群宏基因组总 DNA,随机打断为短片段,并构建合适长度的插入片段文库,对这些文库进行双端(paired-end, PE)测序。通过质控后,将所获得的高质量 reads 集用于后续分析。

### 1.5 生物信息学分析

#### 1.5.1 群落组成分析

使用 QIIME 软件,获取各样本在门、属分类水平上的组成和丰度分布表,对各样本中的优势物种在不同分类水平下进行统计。

#### 1.5.2 $\alpha$ 多样性分析

首先对全体样本种水平的组成谱,在最低测序深度下进行随机重抽样(即“序列量抽样处理”),从而校正测序深度引起的多样性差异,分别对每个样本计算多样性指数。

#### 1.5.3 $\beta$ 多样性分析

Bray-Curtis 距离通过计算 2 个样本中各单元的丰度差值与丰度总和的比值,评估 2 个样本间的差异大小。使用 QIIME 软件,对 PCoA 分析得到的二维或三维数据作图,从而得知基于宏基因组组成的空间分布特征,量化样本间的差异大小。对获得的 Bray-Curtis 距离矩阵进行 UPGMA 聚类分析并进行可视化。

#### 1.5.4 差异分析

对各样本所共有和独有的物种/功能类群进行分析。根据各样本在种水平/功能数据库中注释得到的底层功能单元的组成谱,计算共有、独有物种的数量,并通过 Venn 图直观地呈现各样本所共有和独有的物种数量/功能类群数量。

运用 Python 软件的 SciPy 库对各功能单元丰度表进行组间两两比较检验,获得差异显著性统计分析结果。同时获得每个功能单元在各样本(组)间的倍数差异关系,以  $\log_2(\text{fold\_change\_value})$

表示。默认选取在两组间差异大于 2 倍( $\log_2(\text{fold\_change\_value}) > 1$ )且  $P < 0.05$  的功能单元为具有显著丰度差异的功能类群, 并用于后续绘图和分析。

### 1.5.5 基于 KEGG 数据统计及分析

将注释得到的 KO 结果获取各蛋白对应的 KO 丰度, 并根据每个 KO 所属的分类, 统计注释到的不同等级、不同分类的通路数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 数据质量分析

从每个样本的测序下机原始数据整理发现, 模糊碱基非常少, GC 碱基数量占比约为 44.0%, 90.0% 以上的碱基测定准确率达 99.9%, 95.0% 以上的碱基测定准确率达 99.0% (表 1)。因此, 本次测序原始数据的平均质量达到预期, 可以进行后续分析。

### 2.2 物种水平分析

#### 2.2.1 菌群组成分析

获取大龙六线鱼不同生长阶段肠道微生物门、属水平上的结构组成和丰度分布, 如表 2、

3 所示。门水平上, 差异显著的变形菌门由仔鱼的 94.3% 到稚鱼的 85.9%, 再降低到幼鱼的 39.1%, 厚壁菌门由仔鱼的 2.9% 到稚鱼的 9.9%, 再上升到幼鱼的 59.0%; 其次是放线菌门 (*Actinobacterium*), 稚鱼期含量增加, 丰度达 2.8%, 而幼鱼期降低为 1.6%; 再是拟杆菌门 (*Bacteroidetes*), 丰度呈降低趋势, 由仔鱼的 2.1% 到稚鱼的 0.9%, 再到幼鱼的 0.2%。属水平上, 仔鱼期优势种属依次为弧菌属 (*Vibrio*, 37.8%)、嗜冷杆菌 (*Colwellia*, 20.4%)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*, 18.1%)、硫化菌属 (*Sulfitobacter*, 14.8%) 和发光杆菌属 (*Photobacterium*, 6.6%), 且嗜冷杆菌和假交替单胞菌属和硫化菌属仅在仔鱼期存在一定的丰度。与仔鱼期相比, 稚鱼期优势种属完全不同, 演变为发光杆菌属 (77.8%)、肠球菌属 (*Enterococcus*, 8.4%) 和普罗威登斯菌属 (*Providencia*, 6.3%); 在幼鱼期, 肠道微生物优势种属演变为弧菌属 (32.3%)、乳酸菌属 (*Lactococcus*, 42.5%) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 13.8%)。

表 1 数据质量分析

Table 1 Summary of sequencing data quality

Samples	Reads count	Total count (bp)	N (%)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
O1_1	76 716 274	11 507 441 100	0.000 65	44.22	95.27	89.70
O1_2	73 130 532	10 969 579 800	0.000 65	43.98	95.91	90.71
O1_3	75 362 600	11 304 390 000	0.000 62	43.69	95.85	90.61
O2_1	68 471 698	10 270 754 700	0.000 65	44.67	96.57	92.06
O2_2	84 487 220	12 673 083 000	0.000 64	44.21	95.43	89.83
O2_3	78 135 880	11 720 382 000	0.000 60	44.45	96.20	91.36
O3_1	79 211 776	11 881 766 400	0.000 64	43.82	95.00	89.17
O3_2	67 897 400	10 184 610 000	0.000 65	43.97	96.03	91.13
O3_3	67 104 102	10 065 615 300	0.000 65	44.01	95.39	89.88

N (%) was the percentage of fuzzy bases; GC (%) was the percentage of GC, that was the percentage of G base and C base; Q20 (%) and Q30 (%) were the percentage of the base with determination accuracy of more than 99% and 99.9% in the total base, respectively. O1\_1, O1\_2, O1\_3 represented three parallel samples at larval stage; O2\_1, O2\_2, O2\_3 represented three parallel samples at juvenile stage; O3\_1, O3\_2, O3\_3 represented three parallel samples at young stage. The same below.

表 2 大泷六线鱼肠道微生物样品门水平的物种相对丰度

Table 2 Relative abundance of phylum in different intestinal samples of *Hexagrammos otakii*

Phylum taxonomy	Samples								
	O1_1	O1_2	O1_3	O2_1	O2_2	O2_3	O3_1	O3_2	O3_3
<i>Proteobacteria</i>	92.9	96.2	93.8	82.4	89.5	85.9	39.1	48.5	35.6
<i>Firmicutes</i>	5.1	1.4	2.2	15.8	6.6	7.2	45.2	72.2	53.6
<i>Actinobacterium</i>	0.1	0.2	0.4	0.9	2.5	5.1	0.8	0.4	3.7
<i>Bacteroidetes</i>	1.9	2.2	2.2	0.6	1.2	0.8	0.1	0.2	0.2

表 3 大泷六线鱼肠道微生物 3 个样品属水平的物种相对丰度

Table 3 Relative abundance of genus in different intestinal samples of *Hexagrammos otakii*

Genus taxonomy	Samples								
	O1_1	O1_2	O1_3	O2_1	O2_2	O2_3	O3_1	O3_2	O3_3
<i>Vibrio</i>	28.2	43.9	41.3	0.9	1.0	3.3	32.3	25.3	39.2
<i>Photobacterium</i>	6.6	5.2	8.0	82.1	81.8	69.5	3.0	8.1	5.6
<i>Lactococcus</i>	0.0	0.5	0.1	0.1	0.1	0.0	42.1	55.2	30.3
<i>Sulfitobacter</i>	17.6	13.8	12.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudoalteromonas</i>	23.6	17.7	13.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Coiwellia</i>	24.3	18.7	18.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Enterococcus</i>	0.0	0.0	0.0	7.3	11.0	7.0	0.1	0.3	0.1
<i>Providencia</i>	0.0	0.0	0.0	9.9	6.7	2.2	0.0	0.0	0.0
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	17.6	13.8	10.1

### 2.2.2 $\alpha$ 多样性

不同的指数衡量菌群多样性的侧重点不同。如表 4 显示, 体现菌群丰富度的 Chao1 指数(Chao1 richness estimator)显示, 大泷六线鱼肠道微生物丰富度是随着生长而增加的, 幼鱼期丰富度最高, 达 49.0。Shannon 多样性指数(shannon diversity index)综合考虑了菌群的丰富度和均匀度, 对菌群的丰富度以及稀有物种更敏感, Shannon 指数值越高, 表明菌群多样性越高。Simpson 多样性指数(Simpson diversity index)也是评价菌群多样性的常用指数之一, 对均匀度和菌群中的优势物种更敏感, Simpson 指数值越高, 表明菌群多样性越高。结果显示, 仔鱼期菌群多样性最高, 其次是幼鱼期。

表 4 大泷六线鱼肠道微生物样品  $\alpha$  多样性分析Table 4 Alpha diversity of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*

Samples	Diversity index		
	Chao1	Simpson	Shannon
O1_1	10.0	0.67	2.05
O1_2	38.0	0.82	3.33
O1_3	21.0	0.79	2.85
O2_1	22.0	0.27	1.07
O2_2	17.0	0.13	0.57
O2_3	22.0	0.21	0.91
O3_1	37.0	0.32	0.86
O3_2	58.0	0.67	2.32
O3_3	51.0	0.49	0.69

### 2.2.3 $\beta$ 多样性

通过主坐标分析 PCoA (principal coordinates analysis)对样本距离矩阵进行降维

分解, 展现样本在某种特定距离尺度下的自然分布。如图 1 所示, 每组中各个样本的距离相互接近, 说明组中样本间的物种组成差异较小, 其中 O2 组样本最为集中, O3 组有一平行样本稍有离散; 坐标轴百分比说明, 轴 1 和轴 2 的贡献率分别为 36.7%和 28.0%。

通过非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)以等级树的形式展示各样本间的相似性。如图 1 所示, 每组中各个样本间聚类较紧密, 群落结构相似; 以聚类树的分支长度来看, O3 和 O2 相似性较高。

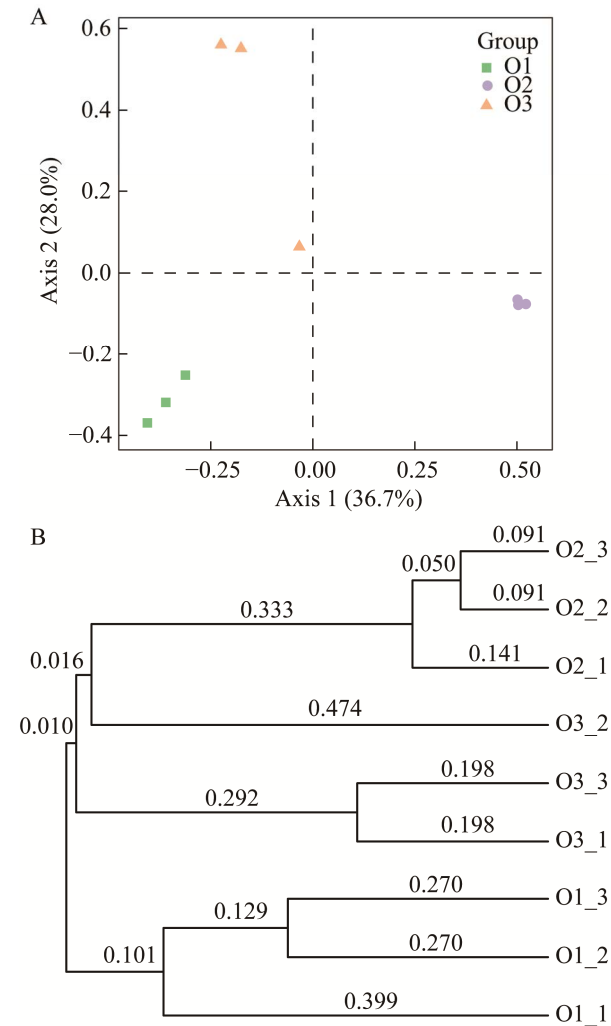


图 1 大泷六线鱼肠道微生物  $\beta$  多样性  
Figure 1 Beta diversity of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. A: PCoA. B: UPGMA.

### 2.2.4 Venn 差异分析

根据各组样本种水平的结构组成谱分析, 如图 2 所示, 大泷六线鱼仔鱼 O1 和稚鱼 O2 共有菌种数量仅为 1, 稚鱼 O2 和幼鱼 O3 共有菌种数量为 5; 稚鱼期 O2 独有的菌种数量达 52, 幼鱼期 O3 独有的菌种数量为 29。

### 2.2.5 曼哈顿图差异分析

对于差异物种通过曼哈顿图 (manhattan plot) 展示分析结果, 用扩增序列变体 (amplicon sequence variant, ASV) 替代操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 提高结果的可靠性。从图 3A 中可以看到, O1 与 O2 (对照) 组间 ASV 存在统计学差异 (种水平出现频次大于等于 0.3 (默认值) 作为条件), 差异显著的 ASV 数量 (彩色圆) 多于无差异的数量 (灰色圆), 且在 O1 期上调的 ASV 居多 (实心彩色圆), 但不同的 ASV 丰度不同 (圆大小代表丰度); 差异物种门水平上按丰度分布表现为变形菌门 > 拟杆菌门 > 放线菌门, 目水平上主要有棒状杆菌目 (*Corynebacteriales*)、红细菌目 (*Rhodobacteriales*)、黄杆菌目 (*Flavobacteriales*)、伯克氏菌目 (*Burkholderiales*)、海洋螺菌目 (*Oceanospirillales*)、硫发菌目 (*Thiotrichales*) 和弯曲杆菌目 (*Campylobacteriales*)。图 3B 中显示, O2 与 O1 (对

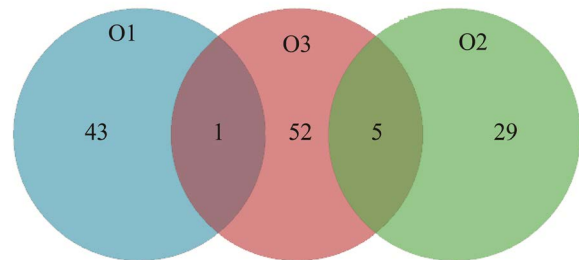
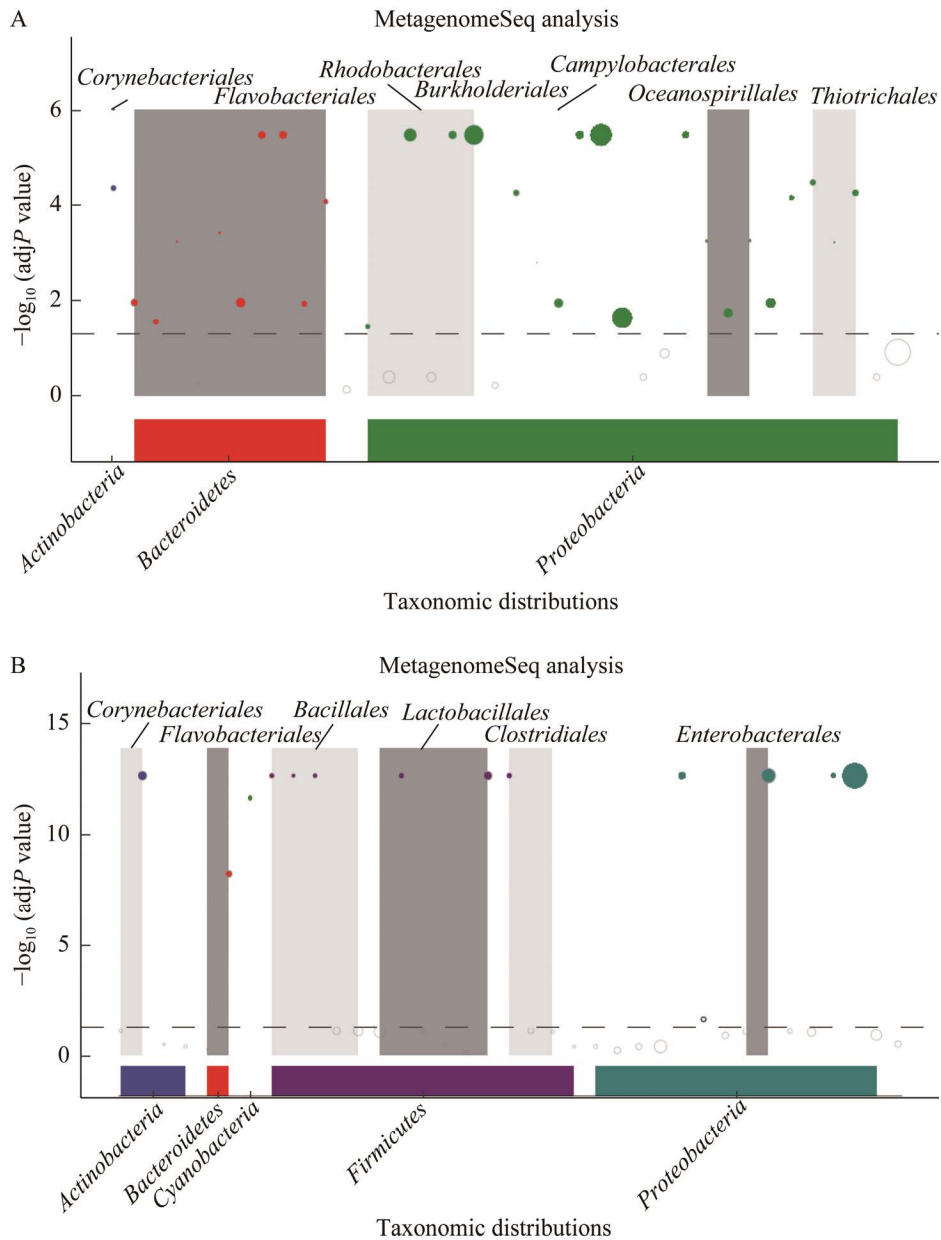


图 2 大泷六线鱼肠道微生物 Venn 图  
Figure 2 Venn analysis of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

照)组间同样存在统计学差异,但与 3A 不同;ASV 差异物种在门水平上主要表现为厚壁菌门>变形菌门>放线菌门>拟杆菌门>蓝菌门,目水平主要有乳酸杆菌目(*Lactobacillales*)、芽孢杆菌目(*Bacillales*)、梭菌目(*Clostridiales*)、棒状杆菌目、黄杆菌目和肠杆菌目(*Enterobacterales*)。图 3C 显示, O2 与 O3 (对照)组间存在统计学差异,下

调的 ASV(空心彩色圆)居多,物种丰度较低;差异物种在门水平上主要分布在厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和蓝菌门(包括芽孢杆菌目、肠杆菌目、黄杆菌目和棒状杆菌目)。O3 与 O2 (对照)组间(图 3D) ASV 差异主要分布在厚壁菌门(包括乳酸杆菌目和芽孢杆菌目),且上调的差异 ASV 数量少、丰度高。





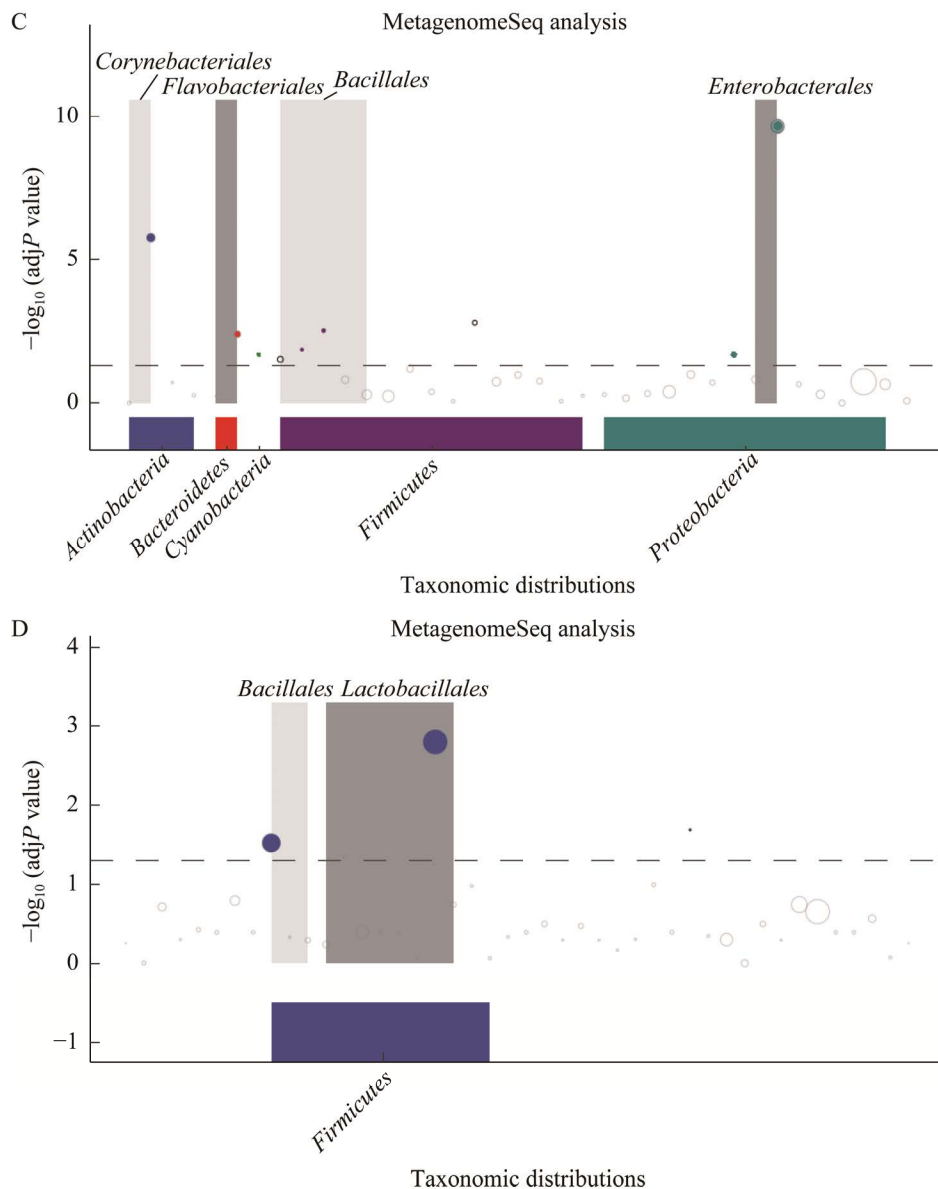


图 3 大龙六线鱼肠道微生物曼哈顿分析

Figure 3 Manhattan plot analysis of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. A: O1\_O2. B: O2\_O1. C: O2\_O3. D: O3\_O2.

### 2.2.6 LEfSe 差异分析

通过 LEfSe (LDA effect size)分析不同组间物种丰度差异, 从而获得显著差异物种。如图 4 显示, 从纵坐标的差异分类单元来看, O3 期差异物种分类单元较少, 其次是 O2 期, 最多的是 O1 期。从横坐标的 LDA 分值来看, O3 期差异物种丰度较高, 分别是厚壁菌门、链球菌科(*Streptococcaceae*)、芽孢杆菌纲、乳酸杆菌目

(*Lactobacillales*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和乳球菌属(*Lactococcus*); O2 期差异物种是托鲁尼发光菌(*Photobacterium toruni*)和发光菌属; O1 期差异物种是变形菌门、嗜冷杆菌属、科尔韦氏菌科、*Colwellia polaris*,  $\alpha$ -变形菌纲、红杆菌科、红杆菌目、亚硫酸杆菌属(*Sulfitobacter*)、暗棕色杆菌属(*Phaeobacter*)、*Phaeobacter inhibens* 和 *Colwellia aestuarii* 等。

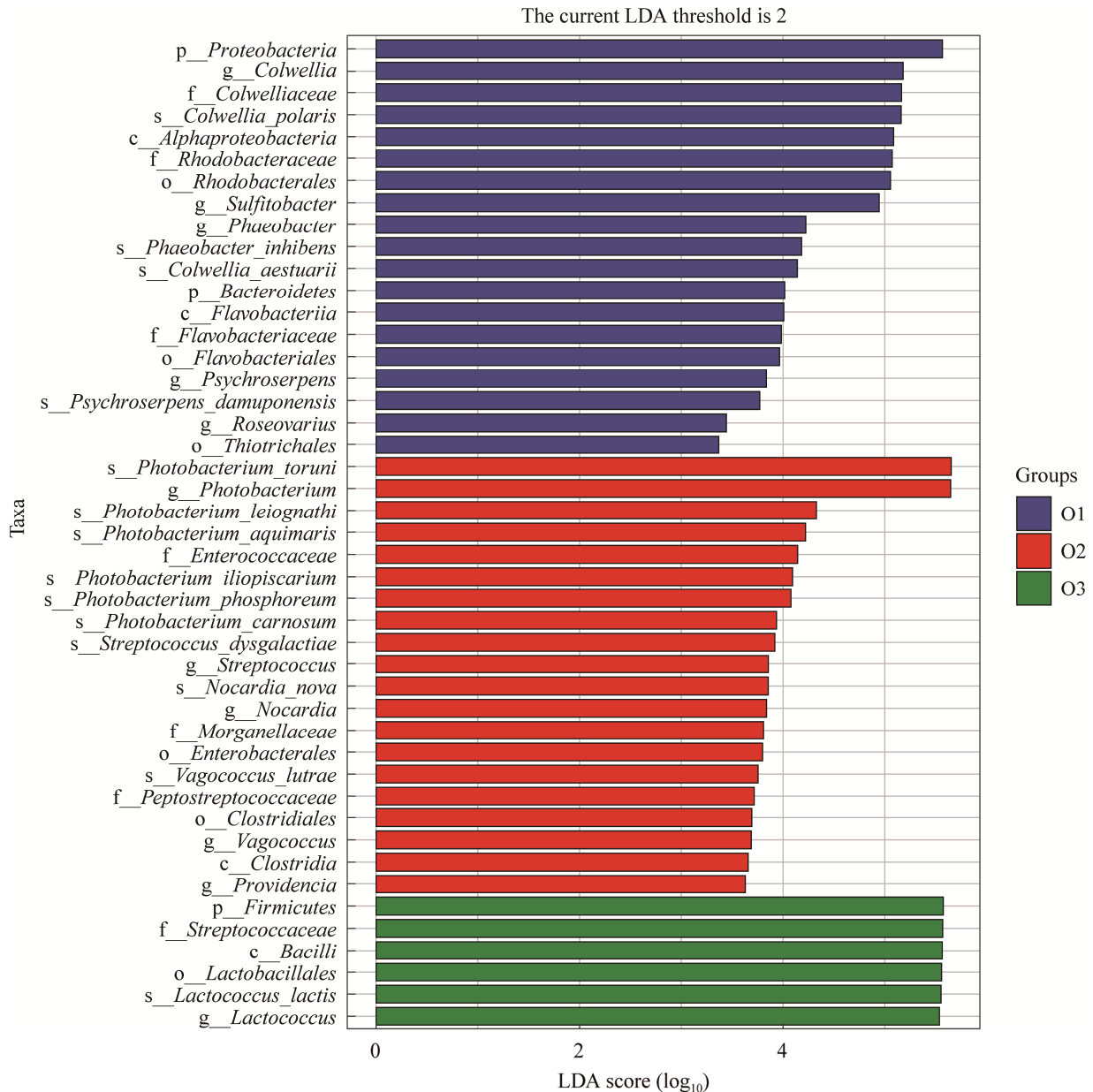


图 4 大泷六线鱼肠道微生物 LefSe 差异分析

Figure 4 LefSe analysis different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

## 2.3 功能水平分析

### 2.3.1 功能类群与代谢通路统计及组成分析

基于 KEGG 数据, 统计注释到不同等级和不同分类的通路, 如图 5 所示。结果表明, 在代谢方面, 大泷六线鱼肠道微生物在碳水化合

物代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、能量代谢以及辅助因子和维生素代谢中起着重要作用; 在遗传信息传递过程中的作用主要是复制和修复, 而在转录方面作用甚少; 在环境信息处理过程中, 主要是在信号传导和细胞膜转运方面。



图 5 大泷六线鱼肠道微生物代谢通路统计(A)及丰度分布(B)

Figure 5 Statistics (A) and relative abundance distribution (B) of pathways based on KO in different intestinal samples of *Hexagrammos otakii*. A: X-axis was number of proteins annotated to the corresponding metabolic pathway, Y-axis was the second level based on KEGG pathways, and the first level classification of each metabolic pathway was listed on the right. O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

而且, 生长过程中代谢通路占绝对优势且丰度增长, 从 O1 期的 56.24%到 O2 期的 60.28%再到 O3 期的 63.40%; 遗传信息传递过程及环境信息处理过程相关通路丰度变化不明显; 细胞处理过程通路组成丰度呈显著递增, O2 期最高, 丰度达 13.55%, 其次是 O3 期, 丰度为

11.54%; 生物系统相关通路组成丰度显著下降, 从 O1 期的 8.91%到 O2 期的 0.89%再到 O3 期的 1.23%。表 5 结果显示与图 5 相似, 从蛋白注释功能上统计, 碳水化合物代谢(3 350)和氨基酸代谢(2 424)占代谢通路主要组成部分; 细胞加工处理方面最多的是原核生物细胞群落类

表 5 以 KO 数据为基础的蛋白注释统计

Table 5 Protein annotation statistics based on KO data

Pathway	Function	Abundance	Pathway	Function	Abundance
Cellular processes	Cell growth and death	299	Metabolism	Amino acid metabolism	2 424
Cellular processes	Cell motility	551	Metabolism	Biosynthesis of other secondary metabolites	380
Cellular processes	Cellular community-eukaryotes	24	Metabolism	Carbohydrate metabolism	3 350
Cellular processes	Cellular community-prokaryotes	1 025	Metabolism	Energy metabolism	1 347
Cellular processes	Transport and catabolism	174	Metabolism	Glycan biosynthesis and metabolism	548
Environmental information processing	Membrane transport	1 336	Metabolism	Lipid metabolism	828
Environmental information processing	Signaling molecules and interaction	12	Metabolism	Metabolism of cofactors and vitamins	1 277
Environmental information processing	Signal transduction	1 296	Metabolism	Metabolism of other amino acids	597
Genetic information processing	Folding, sorting and degradation	527	Metabolism	Metabolism of terpenoids and polyketides	401
Genetic information processing	Replication and repair	1 193	Metabolism	Nucleotide metabolism	1 415
Genetic information processing	Transcription	110	Metabolism	Xenobiotics biodegradation and metabolism	434
Genetic information processing	Translation	714	Organismal systems	Environmental adaptation	127
Organismal systems	Aging	151	Organismal systems	Excretory system	21
Organismal systems	Circulatory system	33	Organismal systems	Immune system	113
Organismal systems	Development	15	Organismal systems	Nervous system	137
Organismal systems	Digestive system	56	Organismal systems	Sensory system	23
Organismal systems	Endocrine system	309			

群(1 025); 环境信息处理方面最多的是膜转运(1 336)和信号转导功能类群(1 296); 遗传信息传递过程最多的则是复制和修复功能类群(1 193)。

### 2.3.2 功能 $\beta$ 多样性分析

图 6 显示了从物种水平的  $\beta$  分析深入到功能水平进行探讨。O1 期样本在横坐标比例范围内较离散, 纵坐标范围内聚集, 功能组成差异

是存在的; O2 期各个样本的距离相互接近, 说明组中样本间的功能组成差异较小, 结果与物种水平相呼应; O3 期其中一样本稍有离散, 与其他两个平行样本间存在明显差异; 坐标轴百分比说明, 各组间差异比例为 26.1%–35.1%。UPGMA 以等级树的形式展示各样本间功能组成的相似度, 结果与 PCoA 一致。

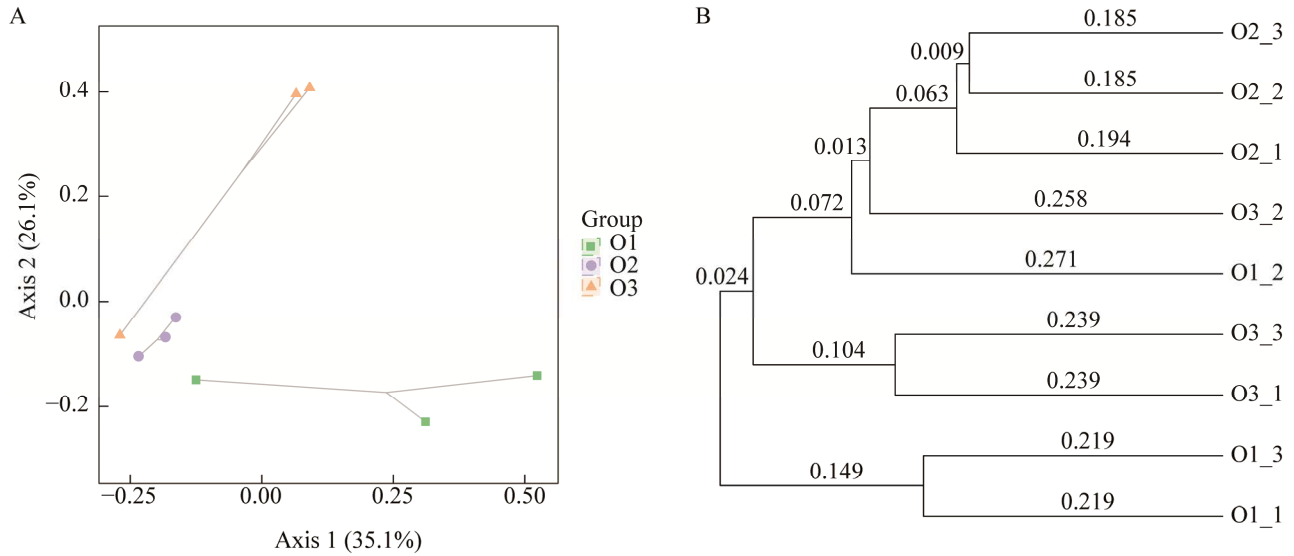


图 6 大龙六线鱼肠道微生物功能  $\beta$  多样性分析

Figure 6 Beta diversity on function of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. A: PCoA; B: UPGMA.

### 2.3.3 Venn 分析

从图 7 中分析, 大龙六线鱼 3 个生长阶段相同的功能类群高达 93 个, O1 期独有的功能类群最多, 为 59 个; O3 期独有的功能类群有 8 个; O2 期与 O1 期相同的有 1 个, 与 O3 期相同的有 6 个。

### 2.3.4 LEfSe 差异分析

LEfSe 分析不光可以找出差异物种, 也可以深入到不同水平的功能类群中去, 找出其中存在组间差异的功能类群, 其相对丰度均值(为对数转换值)和 LDA 效应量大小(默认要求不小于 LDA 阈值)以及 KW 检验  $P$  值(要求 $<0.05$ )均

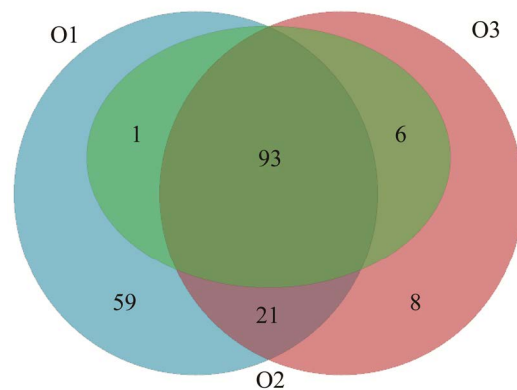


图 7 大龙六线鱼肠道微生物功能 Venn 图

Figure 7 Venn analysis on function of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

呈现了不同程度的差异。图 8 结果显示, O2 期差异主要体现在糖降解功能, 其次是甲烷代谢方面; O3 期差异主要体现在二级代谢物的生物合成, 其次是糖酵解和糖异生; O1 期的差异主要体现在光合作用方面, 其次是神经退行性疾病, 还有环境适应和精氨酸和脯氨酸代谢功能。

表 6 呈现的结果与图 8 相呼应, O2 期差异功能代谢主要体现在能量代谢、聚糖的生物合成和降解等; O1 期差异显著的是细胞的生长、死亡和凋亡, 环境适应能力及氨基酸代谢; O3 期差异显著的功能类群相对增多, 体现在二级代谢物的生物合成, 糖酵解和糖异生等碳水化合物代

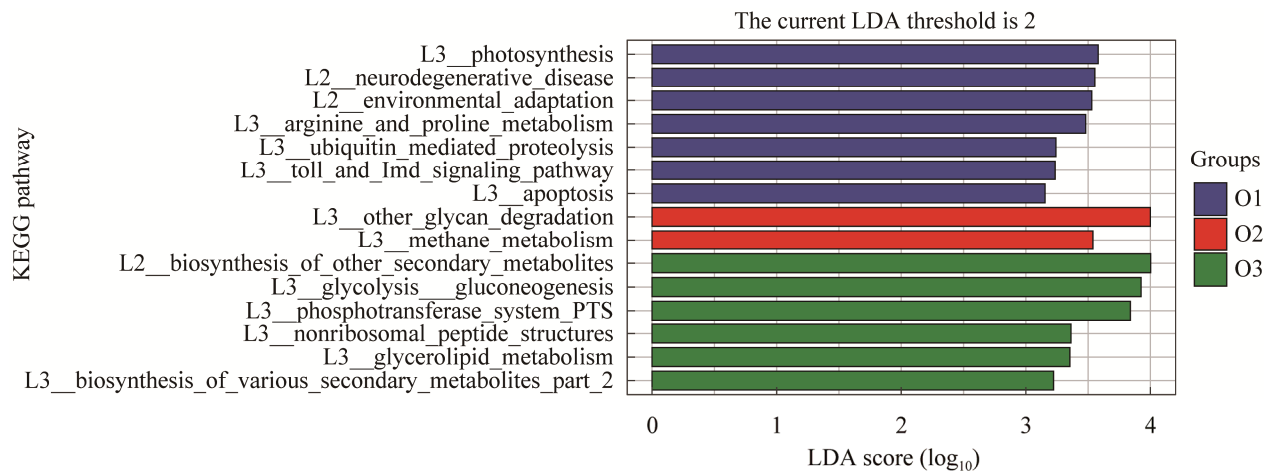


图 8 大泷六线鱼肠道微生物功能 LefSe 差异分析

Figure 8 LefSe analysis on function of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*. O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

表 6 大泷六线鱼肠道微生物差异功能 LefSe 分析结果

Table 6 LefSe analysis on difference function of different intestinal samples in *Hexagrammos otakii*

Taxa	Abundance	Group	LDA_score	P value
Metabolism. Lipid_metabolism. Glycerolipid_metabolism	3.68	O3	3.35	0.05
Metabolism. Energy_metabolism. Methane_metabolism	3.90	O2	3.54	0.04
Metabolism. Biosynthesis_of_other_secondary_metabolites	4.36	O3	4.00	0.04
Environmental_Information_Processing. Membrane_transport. Phosphotransferase_system_PTS	4.17	O3	3.84	0.04
Metabolism. Metabolism_of_terpenoids_and_polyketides. Nonribosomal_peptide_structures	3.40	O3	3.36	0.03
Metabolism. Carbohydrate_metabolism. Glycolysis__Gluconeogenesis	4.23	O3	3.92	0.03
Cellular_Processes. Cell_growth_and_death. Apoptosis	3.36	O1	3.15	0.03
Metabolism. Glycan_biosynthesis_and_metabolism. Other_glycan_degradation	4.27	O2	4.00	0.03
Organismal_Systems. Environmental_adaptation	3.91	O1	3.53	0.03
Metabolism.Amino_acid_metabolism. Arginine_and_proline_metabolism	3.91	O1	3.48	0.03

O1: Larval stage; O2: Juvenile stage; O3: Young stage.

谢, 环境信息处理包括膜运输、磷酸转移酶系统, 脂代谢过程, 萜类化合物和聚酮类化合物的代谢等。

### 3 讨论与结论

在动物生长过程中, 肠道微生物发挥着极其重要的作用, 长期的协同进化过程使其与宿主间形成了相互影响的共生关系, 肠道菌群也被称为宿主的“外在器官”, 在宿主的营养代谢、免疫调节和疾病防控等方面均发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。基于传统的培养技术来分析和获得鱼类肠道微生物的组成研究由来已久, 但肠道中的微生物大多数不能进行培养分离, 这一现象促使一些新的先进方法不断涌现, 例如差异梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)<sup>[9]</sup>、时间温度梯度凝胶电泳(temporal temperature gradient gel electrophoresis, TTGE)<sup>[10]</sup>和 16S 扩增子高通量测序<sup>[11]</sup>以及宏基因组学<sup>[12-13]</sup>等。然而, 由于肠道微生物群落的多样性较高, 且关键物种的相对丰度不同, 应用宏基因组测序了解不同宿主并构建其肠道不可培养微生物的基因组仍然具有挑战性<sup>[14]</sup>。在这里, 我们通过宏基因组测序来了解大泷六线鱼不同生长期(仔、稚和幼鱼)肠道微生物系统发育组成及功能, 明确不同营养对肠道共生菌构成的驱动作用; 而且从这些样本中构建了关键微生物物种的功能网络, 进一步阐述肠道菌群对宿主大泷六线鱼生长发育的重要性以及对健康或疾病防控的作用, 为大泷六线鱼的健康养殖拓展思路, 为饲料营养等辐射学科提供依据。

肠道菌群的丰度变化可以改变宿主的适合度, 且多种因素可影响肠道菌群的结构变化, 研究表明宿主的遗传背景和食物给予是肠道菌群变化的主要驱动因素<sup>[15-16]</sup>。大泷六线鱼仔鱼孵出 6-7 日龄后, 开始摄食轮虫, 后稚鱼期加

投卤虫无节幼体, 由内源性营养成功过渡到外源性营养, 摄食量逐渐增大, 生长迅速; 48 日龄后, 开始投喂配合饲料, 生长速度趋缓, 并逐渐稳定<sup>[17]</sup>。本研究中宏基因组测序提供了功能菌群丰度细微变化所呈现的敏感性。 $\alpha$  多样性表明幼鱼期肠道微生物组成丰富度最高, 生长过程递增的原因可能是由于动物机体肠道组织生理机能完善的需要, 还有外源营养给予的双重促进因素, 从轮虫到卤虫再到配合饲料, 鱼肠道细菌随着摄食行为及种类的变化而使特定菌株在肠道内逐步定殖, 这与李靖<sup>[18]</sup>对养殖刺参 *Apostichopus japonicus* 早期发育阶段菌群结构的演替、Sugita 等<sup>[19]</sup>对牙鲆仔稚鱼消化道细菌种类的研究以及史秀清等<sup>[20]</sup>对大鳞鲆仔稚鱼发育期消化道可培养细菌菌群的分析结果相似, 消化道菌群会随投喂饵料的不同而变化, 养殖饵料对体内肠道菌群的建立和演替均起到重要作用。多样性是在仔鱼期最高, 仔鱼期投喂轮虫饵料, 作为活生物饵料的轮虫以微生物为食, 其自身含有较为丰富的微生物菌群, 因此影响了鱼肠道多样的微生物区系。在稚鱼期生物饵料换成卤虫, 由于卤虫饵料在卤虫卵孵化前进行了冲洗和消毒, 卤虫无节幼体尚未摄食, 因此其微生物种类和数量比轮虫低, 鱼肠道在此生长阶段多样性有所降低。 $\beta$  多样性 PCoA 分析各生长阶段肠道微生物菌群组成无交叉, 且与基于距离的 UPGMA 分析的组内结果相一致, 幼鱼期平行样本组成出现离散, 说明肠道菌群不是简单的微生物群落的反映, 而是由于物种特有的选择压力、可能依赖的行为、免疫及其代谢特征等共同导致的变化, Li 等也论证了这一观点<sup>[21]</sup>。

本研究宏基因组数据显示, 大泷六线鱼生长过程中肠道微生物的群落组成存在明显差异。在属水平上分析, 幼鱼期独有的优势菌群

较多,属于厚壁菌门的乳酸菌属、芽孢杆菌属和肠球菌属丰度增加,而在发育早期的仔鱼肠道内优势菌群较单一,这与刘增新等<sup>[22]</sup>对牙鲆仔稚鱼的研究结果相似,随着生长发育,肠道微生物对菌群作用具有一定的选择性,为适应外源营养的消化、吸收以及生长方式的变化,肠道微生物与宿主发生了同步进化,调控机体营养、免疫、代谢活动<sup>[23]</sup>。然而,弧菌属在后稚鱼期含量骤减,可能是由于环境及操作的影响,稚鱼期投喂从鲜活生物饵料转为配合饲料,外源弧菌量降低,再加上生长迅速期水环境更换相对频繁,水质条件呈现了优势,因此,共同影响降低了弧菌属的丰度。稚鱼期肠道微生物中发光杆菌属含量占明显优势,其他菌属丰度较低,推测原因可能是鱼肠道发育未完全,体积、面积及功能都非常有限,外源微生物进入肠道后短期内无法定殖、繁殖;然而,发光杆菌属于养殖用水、饵料来源的机会菌<sup>[18]</sup>,摄入后定殖鱼肠道内成为共生菌、常居菌,肠道微生物在演变过程中共生菌可通过合成和分泌多种初生和次生代谢产物来提供良好的生理环境、维持宿主常规的代谢规律,在肠道及生长发育关键时期随着肠道菌群的平衡而随之增殖<sup>[24]</sup>。

稚鱼期和幼鱼期之间共有菌群居多,但也存在统计学差异。仔鱼期主要就是变形菌门和红杆菌目,分析原因是外源给予带来的菌群优势,其大量繁殖在肠道菌群形成初期可能是感染疾病的主要原因<sup>[25]</sup>,因此在鱼生长过渡期需严格控制环境变化,稚鱼期弧菌属丰度降低也可能有这部分操作原因。研究报道,如果仔鱼在混合营养期内没有建立外源性营养关系,则是鱼发育中的一大障碍,或将导致生长停滞及死亡<sup>[26]</sup>,即也说明肠道微生物结构的改变对生长发育具有举足轻重的作用。幼鱼期丰度较高的差异物种为芽孢杆菌纲和乳酸杆菌目,推测

缘由是鱼生长发育过程中,幼鱼阶段各器官、系统和生理机能均处于发育完善阶段,肠道微生物对外源营养的选择性增强,只有适应消化道微生态环境的菌群才可成为优势菌,参与生长发育多样化的代谢活动,因此在该生长期给予外源促生长的益生菌大多包括乳酸菌或芽孢杆菌<sup>[27-28]</sup>,这些微生物能够在鱼肠道中生长、繁殖。

研究表明,肠道微生物在营养物质的代谢过程起到了关键作用,微生物与宿主细胞之间的联系性就主要体现在微生物食物链提供的直接底物<sup>[29]</sup>。本研究依据 KEGG 数据统计,各通路相对丰度变化结果表明,肠道微生物代谢功能主要包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢及能量代谢等等,且在生长过程中呈现递增趋势,这也说明了肠道微生物演替过程通过上调某些通路来弥补生长所需,参与这些功能的微生物菌群相对丰度也随之增加,如幼鱼期厚壁菌门、乳酸菌属和芽孢杆菌属等丰度增加,它们可以在肠道中发酵碳水化合物和蛋白质等,从而帮助鱼从配合饲料中获取营养和能量<sup>[30]</sup>;而且,不易消化的碳水化合物通过其微生物菌群在肠道中发酵,产生为微生物生长所需的能量,对宿主健康具有深远的影响<sup>[31]</sup>。另一方面,蛋白注释功能上的分析结果与之一致,然而,幼鱼期的特殊性及其具体作用机制有待进一步研究。由功能 VENN 图发现,稚鱼肠道微生物功能处于关键的过渡阶段,共有 100 个功能类群,其中有 93 个是共有类群,其余 1 个是和仔鱼期共有,6 个是和幼鱼期共有,这可能是由于稚鱼期是内源饵料和外源饲料、生物饵料和配合饲料过渡的中间阶段,微生物组成及功能均需依据饮食需求及环境发生转变,再加上不同生长阶段鱼机体组织的内源性遗传因素影响,说明宏基因组功能组成和分类学组成之间存在很强的相关性,其他研究<sup>[3,32]</sup>也体现了这



一结果。

从功能类群差异方面分析,仔鱼期细胞的生长过程较活跃,遗传物质信息处理占比最多,在细胞运动中参与过高说明在组织发育及机体生长过程中肠道微生物对营养物质的搜寻驱动增强,丰度的增加可提高微生物对信号的感知力,然而这种感知力在对待营养物质和有害物质过程中非常重要,因此在研究生长特征或外源因素的影响时总是体现其变化<sup>[32-33]</sup>。同时肠道菌群在演变过程中还与宿主信号转导及分泌系统等相关<sup>[34]</sup>,可能因为生物饵料成分的存在提高了光合作用功能,因此相应通路也存在明显差异。仔鱼期还有部分差异功能体现在氨基酸代谢方面,可能是因为在鱼孵化后短期内肠道器官还未发育完善,上皮细胞等组织未能完全吸收肠道内的氨基酸,其余生长期内的氨基酸需要由肠道菌群产生的酶(如蛋白酶等)降解来供给,因此该功能通路丰度提高。在鱼机体完成适应后渐入稚鱼期,稚鱼期作为过渡关键期,尤其是饲料的转换,肠道菌群需要较多的能量,主要来自于糖发酵过程,肠道菌群在此过程中发挥着核心作用,其代谢多糖产生短链脂肪酸,乙酸、丙酸和丁酸等主要成分可促进宿主对营养物质的消化吸收<sup>[35]</sup>。到幼鱼期,稳定的肠道菌群组成富集了高丰度的代谢途径,主要参与了碳水化合物代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、能量代谢以及辅助因子和维生素代谢等,平衡了能量和蛋白质等营养状态,从而可提高饲料消化利用率和营养物质的合成效率。目前我们相关研究结果仅是基于测序数据以及功能途径的预测,相关验证数据较少,其影响机制还需进一步验证。然而,自然界中非可培养微生物作为巨大基因库是可以发掘利用的宝贵资源,从中寻找潜在的标志物或关键物种或新的活性代谢产物是可行的。

## 参考文献

- [1] WALTER J, BRITTON RA, ROOS S. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(Suppl 1): 4645-4652.
- [2] NAYAK SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11): 1553-1573.
- [3] SULLAM KE, ESSINGER SD, LOZUPONE CA, O'CONNOR MP, ROSEN GL, KNIGHT R, KILHAM SS, RUSSELL JA. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3363-3378.
- [4] SCOTT KP, GRATZ SW, SHERIDAN PO, FLINT HJ, DUNCAN SH. The influence of diet on the gut microbiota[J]. Pharmacological Research, 2013, 69(1): 52-60.
- [5] LYONS PP, TURNBULL JF, DAWSON KA, CRUMLISH M. Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(5): 2438-2452.
- [6] LI EC, XU C, WANG XD, WANG SF, ZHAO Q, ZHANG ML, QIN J, CHEN LQ. Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2018, 26(3): 381-399.
- [7] HU FW, PAN L, GAO FX, JIAN YX, WANG X, LI L, ZHANG SC, GUO W. Effect of temperature on incubation period and hatching success of fat greenling (*Hexagrammos otakii*Jordan & Starks) eggs[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(1): 361-365.
- [8] SINGH BK, CAMPBELL CD, SORENSON SJ, ZHOU JZ. Soil genomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(10): 756.
- [9] HUBER I, SPANGGAARD B, APPEL KF, ROSSEN L, NIELSEN T, GRAM L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(1): 117-132.
- [10] NAVARRETE P, MAGNE F, MARDONES P, RIVEROS M, OPAZO R, SUAUA A, POCHART P, ROMERO J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 71(1): 148-156.

- [11] FAN Y, WANG XL, WANG YH, YE HB, YU XQ, WANG SX, DIAO J, XU L, GAI CL, LIU HJ, MA DP. Effect of dietary *Bacillus licheniformis* on growth, intestinal health, and resistance to nitrite stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(6): 2555-2573.
- [12] RAPPÉ MS, GIOVANNONI SJ. The uncultured microbial majority[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 369-394.
- [13] HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J, GOODMAN RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249.
- [14] 孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 393-401.  
SUN X, GAO Y, YANG YF. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 393-401 (in Chinese).
- [15] DENG YL, KOKOU F, EDING EH, VERDEGEM MCJ. Impact of early-life rearing history on gut microbiome succession and performance of *Nile tilapia*[J]. *Animal Microbiome*, 2021, 3(1): 81.
- [16] ZHANG WQ, ZHU ZD, CHEN J, QIU QF, XIONG JB. Quantifying the importance of abiotic and biotic factors governing the succession of gut microbiota over shrimp ontogeny[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 752750.
- [17] 潘雷, 房慧, 张少春, 王雪, 菅玉霞, 胡发文, 高凤祥, 郭文. 大泷六线鱼仔、稚、幼鱼期消化酶活力的变化[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 54-60.  
PAN L, FANG H, ZHANG SC, WANG X, JIAN YX, HU FW, GAO FX, GUO W. The variation of digestive enzymes in larval and juvenile *Hexagrammos otakii*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 54-60 (in Chinese).
- [18] 李靖. 养殖刺参早期发育阶段菌群结构演替及潜在益生菌的筛选[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2018.  
LI J. Study on the succession of microflora in *Apostichopus japonicus* during the early developmental stages and the screening of potential probiotics[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [19] SUGITA H, OKANO R, SUZUKI Y, IWAI D, MIZUKAMI M, AKIYAMA N, MATSUURA S. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(5): 1004-1011.
- [20] 史秀清, 张正, 王印庚, 于永翔, 邓威, 李华. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 73-82.  
SHI XQ, ZHANG Z, WANG YG, YU YX, DENG W, LI H. The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of turbot (*scophthalmus maximus*) larvae[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 73-82 (in Chinese).
- [21] LI TT, LONG M, GATESOUBE FJ, ZHANG QQ, LI AH, GONG XN. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(1): 25-36.
- [22] 刘增新, 柳学周, 史宝, 徐永江, 刘权. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道菌群结构比较分析[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 111-119.  
LIU ZX, LIU XZ, SHI B, XU YJ, LIU Q. Composition of intestinal bacterial community of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during early life stages[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 111-119 (in Chinese).
- [23] GRIER A, QIU X, BANDYOPADHYAY S, HOLDEN-WILTSE J, KESSLER HA, GILL AL, HAMILTON B, HUYCK H, MISRA S, MARIANI TJ, RYAN RM, SCHOLER L, SCHEIBLE KM, LEE YH, CASERTA MT, PRYHUBER GS, GILL SR. Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and preterm infant growth[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 158.
- [24] 陈芳敏. 基于中华真地鳖和鱿鱼的动物肠道共生菌多样性及宿主—微生物相互作用关系研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2016.  
CHEN FM. A study on the diversity of animal gut microbial symbionts and the host-microbe interactions based on eupolyphage *Sinensis walker* and *Euprymna scolopes*[D]. Ya'an: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [25] SKJERMØ J, VADSTEIN O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae[J]. *Aquaculture*, 1999, 177(1/2/3/4): 333-343.
- [26] 李传明. 食物营养和肠道菌群对稻纵卷叶螟生长发育的影响[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2021.  
LI CM. Effects of food nutrition and gut microbiota on growth performance of the rice leafroller *Cnaphalocrocis medinalis*(Güenée)[D]. Yangzhou:

- Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2021 (in Chinese)
- [27] FAN Y, WANG XL, WANG YH, LIU HJ, YU XQ, LI L, YE HB, WANG SX, GAI CL, XU L, DIAO J, GUO PP. Potential effects of dietary probiotics with Chinese herb polysaccharides on the growth performance, immunity, disease resistance, and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2021, 52(6): 1194-1208.
- [28] RAMOS MA, WEBER B, GONÇALVES JF, SANTOS GA, REMA P, OZÓRIO ROA. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 166(2): 302-307.
- [29] KOHL KD. Diversity and function of the avian gut microbiota[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2012, 182(5): 591-602.
- [30] SPOR A, KOREN O, LEY R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(4): 279-290.
- [31] RAWLS JF, SAMUEL BS, GORDON JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(13): 4596-4601.
- [32] NAVARRETE P, MAGNE F, ARANEDA C, FUENTES P, BARROS L, OPAZO R, ESPEJO R, ROMERO J. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31335.
- [33] 吕于明, 刘丹, 张炳坤. 家禽肠道屏障功能及其营养调控[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 3091-3100.
- GUO YM, LIU D, ZHANG BK. Intestinal barrier of poultry: Function and modulation[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(10): 3091-3100 (in Chinese).
- [34] NEISH AS. Microbes in gastrointestinal health and disease[J]. Gastroenterology, 2009, 136(1): 65-80.
- [35] 杨天龙, 刘旭川, 廖奇, 王淑玲, 张春勇, 葛长荣, 冷静. 宏基因组技术在鸡肠道微生物中应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 659-666.
- YANG TL, LIU XC, LIAO Q, WANG SL, ZHANG CY, GE CR, LENG J. Application advances of metagenome technology in intestinal microorganisms of chicken[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(3): 659-666 (in Chinese).