

摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠道微生物组成

王健, 王玲, 鲁康乐, 宋凯, 张春晓

(厦门市饲料检测与安全评价重点实验室, 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以豆粕为主要蛋白源制作牛蛙饲料, 饲喂 56 d 后, 采集牛蛙肠粘膜 (DC) 及肠腔内容物 (DN) 样品, 利用 16S rDNA 测序技术, 对其肠道微生物组成进行分析。结果如下: 1) 摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠道优势菌群为变形菌 (Proteobacteria)、梭杆菌 (Fusobacteria) 和厚壁菌 (Firmicutes)。2) DN 组微生物丰度指数和多样性指数大于 DC 组, 但未具显著差异性 ($P > 0.05$), 而 DC 组内样品微生物组成的重复性好于 DN 组。3) DN 组在门分类水平优势菌群为变形菌 (75%)、厚壁菌 (15%) 和梭杆菌 (5%), 在属分类水平上不具规律性; DC 组在门分类水平上优势菌群为具有分解纤维能力梭杆菌 (78%) 和变形菌 (20%), 在属分类水平上为具发酵利用碳水化合物的鲸杆菌属 (*Cetobacterium*) 75%。4) 牛蛙肠粘膜上定植一定比例的埃希氏菌-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*) 和爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*)。以上结果表明, 牛蛙肠粘膜更适合作为评价饲料对肠道菌群影响的组织, 而牛蛙肠粘膜上高比例的梭杆菌门菌可能是牛蛙能够高效利用植物蛋白原料的原因之一。

[关键词] 牛蛙; 16S rDNA; 肠粘膜; 肠内容物; 微生物菌群

[中图分类号] S 966.31

An Analysis of the Gut Microbial Community of Bullfrog (*Rana(Lithobates) catesbeiana*) Fed with Soybean Meal Based Diets

WANG Jian, WANG Ling, LU Kangle, SONG Kai, ZHANG Chunxiao

(Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation & Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, bullfrog (*Rana(Lithobates) catesbeiana*) were fed with soybean meal based diets. After feeding for 56 d, the intestinal mucosa layer (DC) and the intestinal digesta (DN) samples of the bullfrog ((133.56 ± 0.14) g) were collected, then the microbial community was analyzed by the 16S rDNA sequencing technology. The results are as follows: 1) The most dominant bacterial phyla were Proteobacteria, Fusobacteria, and Firmicutes. 2) The microbial abundance index and diversity index of DN were larger than those in DC, however, there was no significant difference between the two sample units ($P > 0.05$). The bacterial taxonomic composition showed better repeatability among all DC samples than that among all DN samples. 3) At phylum level, the dominant bacterial in DN were Proteobacteria(75%), Firmicutes(15%) and Fusobacteria(5%), while there was no obvious regularity at genus level. In DC, the dominant bacteria were Fusobacteria(78%) and Proteobacteria(20%). At phylum level, and at genus level, the most dominant bacteria was *Cetobacterium*, which was able to ferment and utilize carbohydrates. 4) It also found some *Escherichia-Shigella* and *Edwardsiella*

[收稿日期] 2018-03-30

[修回日期] 2018-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31602172); 福建省科技计划项目 (2017N0021); 福建省中青年教师教育科研项目 (JA15284)

[作者简介] 王健 (1991—), 男, 硕士生, 从事水产动物营养与饲料研究。通信作者: 王玲 (1977—), 副教授, 从事水产动物营养与饲料学, E-mail: lingwang@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

colonized the intestinal mucosa layer. These results suggest that the intestinal mucosa layer of bullfrog is more suitable for evaluating the influence of feed on microbial community, and the high abundance of Fusobacteria and *Cetobacterium* in bullfrog's intestinal mucosa layer maybe a reason for that bullfrogs can use plant ingredients efficiently.

Keywords: bullfrog; 16S rDNA; intestinal mucosa layer; intestinal digesta; microbial community

0 引言

肠道是动物机体与外界环境接触最为密切的器官之一,也是最大的免疫器官,在肠道中共生着大量微生物。大部分肠道微生物与动物构成共生关系,相互依赖,在动物的生长、营养、免疫等方面均发挥着重要的作用^[1-2]。研究表明,仔猪小肠中的微生物能大量代谢必需氨基酸,参与氨基酸的肠道首过代谢,并且对氨基酸表现出较强的合成能力^[3];牛的瘤胃中的微生物可以帮助其消化植物纤维,摄取所需能量,还具有分解有毒物质的能力^[4-5];大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)肠道中微生物与碳水化合物、氨基酸、蛋白质、核酸代谢功能相关^[6]。因此,研究动物生理,尤其是营养代谢,必须考虑肠道微生物作用。

在过去对肠道微生物组成的研究中,传统方法如 DGGE、TGGE、T-RFLP、FISH 等,往往会很大程度地低估肠道微生物的物种组成并高估其丰度^[7]。高通量测序技术具有较高准确性和灵敏度的优势,不需要进行肠道微生物的分离和培养,只要提取到肠道微生物 DNA 后,就能得到相应菌种信息,能够较为完整地反映肠道微生物结构。王程程等^[8-9]的研究表明,高通量测序技术相比传统方法更具优势,鉴定所得肠道微生物组成信息更为完整。目前,高通量测序技术已经在黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)^[10]、大菱鲂^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[12-13]等多种水生动物肠道微生物研究中运用,是目前对动物肠道微生物研究中应用最广泛的方法之一。

牛蛙(*Rana (Lithobates) catesbeiana*)是我国福建、广东、浙江和海南等地重要的养殖种类之一,2013 年国内牛蛙养殖产量已达 15 万 t 以上^[14]。研究表明,大多数动物缺乏内源性纤维素消化酶基因,纤维素的消化主要依靠肠道内与纤维素降解相关的菌群^[15-16],因此肠道微生物组成很大程度上决定了动物利用植物原料能力的高低。已有研究发现牛蛙对豆粕耐受能力较强^[17],并且对植物性蛋白原料有较高的表观消化率^[18]。根据以往研究结果推测,摄食植物性蛋白原料的牛蛙肠道中应存在较高比例与植物性原料消化相关的菌群,然而,目前尚未有对牛蛙肠道微生物组成的相关报道。本文将运用高通量测序技术,研究摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠粘膜及肠腔内容物的微生物组成,拟从肠道微生物组成来解释牛蛙对豆粕有较高利用率的原因,并为深入研究牛蛙营养代谢机制提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

试验用饲料以豆粕为主要蛋白源,鱼油、豆油和卵磷脂为主要脂肪源,粗蛋白质量分数为 40%、脂肪质量分数为 7%。饲料原料粉碎后全部通过 60 目筛网,用水产饲料膨化机制成 4.0 mm 的膨化颗粒饲料,自然晾干后于 -20 ℃ 冰箱中保存。试验饲料配方和化学组成见表 1。

1.2 试验牛蛙的养殖管理

养殖蛙苗为厦门市同安区一养殖场提供的同批次孵化蛙苗。正式试验开始前,牛蛙暂养于室内水族缸(1.5 m × 0.7 m × 0.6 m)中,投喂商业牛蛙饲料(由福建省海新集团有限公司提供)。暂养 15 d 后,停食 24 h,挑选个体大小均匀,体表无损伤的健康牛蛙随机分配到室内 6 个水族缸(0.7 m × 0.4 m × 0.4 m)中,除排列位置外,各缸管理、光照、用水均保持一致。试验牛蛙初始体重为(40.01 ± 0.24)g,每个养殖缸放养 14 只牛蛙,每天投喂 2 次(8:00,18:00),达表观饱食状态。养殖试验持续 56 d。试验期间水温 30 ~ 32 ℃,投喂前半小时对各缸进行清洗和换水,水位为 3 ~ 5 cm。

表1 试验饲料配方及营养组成(干物质)

Tab. 1 Ingredients and proximate composition of experimental diet(dry-matter basis)

原料 Ingredients	质量分数 Content/%	原料 Ingredients	质量分数 Content/%
豆粕 Soybean meal	60.00	维生素混合物 Vitamin premix ²⁾	0.10
面粉 Wheat flour	28.79	乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.05
卵磷脂 Lecithin	1.00	无机盐混合物 Mineral premix ³⁾	0.50
豆油 Soybean oil	2.00	碳酸钙 CaCO ₃	3.15
鱼油 Fish oil	3.00	赖氨酸盐酸盐 Lysine - HCl	0.28
胆碱 Choline	0.50	DL-蛋氨酸 DL - Methionine	0.48
抗坏血酸多聚磷 L - ascorbate - 2 - phosphate	0.10	总蛋白 Crude protein	40.70
防霉剂 Antimold ¹⁾	0.05	总脂肪 Crude lipid	7.08

说明: 1) 参考文献 [19]; 2), 3) 参考文献 [18]。

Notes: refer to referenc [19]; 2), 3) refer to reference [18].

1.3 肠道样品采集

56 d 试验结束时停食 24 h 后, 选择健康状况良好、大小相似的牛蛙(平均体重为(133.56 ± 0.14)g), 每缸 6 只, 用双毁髓法处死, 剪下牛蛙肠道并用镊子按压收集牛蛙肠腔内容物置于灭菌冻存管中; 收集完成后剪开肠段, 用无菌生理盐水冲洗肠粘膜, 取另一冻存管存放肠粘膜样品; 每 2 个养殖缸样品混合视为同一样品。样品采集完成后迅速放入液氮中保存, 用于微生物多样性分析。

1.4 细菌 V3 + V4 区微生物多样性测序

提取样品总 DNA 后, 根据保守区设计得到引物, 在引物末端加上测序接头, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化后形成测序文库, 对建好的文库先进行文库质检, 质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2500 进行微生物多样性测序。

1.5 计算和统计方法

使用 QIIME (Version 1.8.0) 软件中的 UCLUST 对 Tag 在 97% 的相似度水平下进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类分析; 利用 QIIME 软件生成不同分类水平下的物种丰度表; 使用 Mothur (Version 1.30) 软件, 对样品 Alpha 多样性指数 (Chao1、Ace、Shannon、Simpson) 进行评估; 使用 SPSS 18.0 软件对数据进行方差分析, 实验结果采用 (平均值 ± 标准误差) 表示; 基于 unweighted unfrac 算法得到样本间距矩阵用于主成分分析 (PCA); 基于 non-parametric factorial Kruskal - Wallis (KW) sum - rank test (非参数因子克鲁斯卡尔-沃利斯秩和检验) 检测具有显著丰度差异特征, 用线性判别分析 (LDA) 来估算差异大小。本文所有图均根据数据用 R 语言工具绘制。

2 结果

2.1 数据过滤、拼接及稀释曲线

对牛蛙肠腔内容物样品 (DN) 和肠粘膜样品 (DC) 中细菌的 16S rDNA 基因的 V3 - V4 区测序, 所有样品经过双端 reads (PE read) 拼接后得到 517 972 条原始序列 (Raw Tags), 经过原始序列过滤后得到的优化序列 (Clean read) 共有 487 821 条, 平均每个样品产生 81 303 条序列, 最多的产生 108 448 条, 最少的 65 443 条, 样品平均序列长度 (AvgLen) 为 436.17 bp, 优化序列数平均占原始双端 reads 总数的 63.035%, 表明本次提取样品的 DNA 质量良好。

稀释性曲线 (见图 1) 显示, 当抽取序列数达

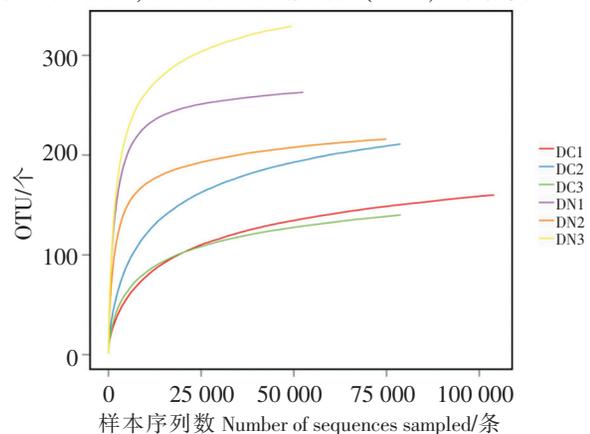


图1 各样品稀释性曲线

Fig.1 Multy samples rarefaction curves among different samples

说明: DC 为牛蛙肠粘膜样品; DN 为牛蛙肠腔内容物样品。

Notes: DC represented the sample of intestinal mucosa; DN represented the sample of intestinal digesta.

到 50 000 条时, 每组样品的稀释曲线都趋于平坦, 说明测序数据量足够大, 更多的数据量对发现新 OTU 的贡献很小, 表明此次测序样本抽取序列充分, 结果可靠。

2.2 牛蛙肠粘膜及肠腔内容物微生物 OTU 划分及 Alpha 多样性比较

表 2 为将样品序列按最小序列数进行标准化后, 在 97% 相似度水平下, 比较 Alpha 多样性指数。结果显示, 在 0.99 的样本文库覆盖率下, 样品间 OTU 数量、丰度指数 Ace 及 Chao1, DN 组均大于 DC 组, 但未具显著性 ($P > 0.05$); 多样性 Shannon 指数差异不显著 ($P > 0.05$); Simpson 指数 DN 组显著低于 DC 组 ($P < 0.05$)。

表 2 不同样品微生物群落的丰度和多样性指数

Tab.2 Richness and diversity index of bacterial community for different samples

Sample ID 样品	OTU	Ace	Chao 1	Simpson	Shannon	覆盖率 Coverage
DC	170.33 ± 21.14	195.26 ± 20.30	198.78 ± 19.53	0.60 ± 0.10 ^a	2.12 ± 1.26	0.99
DN	269.33 ± 32.77	282.18 ± 34.14	281.72 ± 33.36	0.21 ± 0.06 ^b	2.67 ± 0.25	0.99

说明: 同一列数据的肩标不同字母, 则表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: In the same column values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

2.3 门、属分类水平上牛蛙肠粘膜及肠腔内容物微生物组成

物种分布柱状图显示, 在门分类水平 (见图 2) 上, DC 组中梭杆菌门 (Fusobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria) 为牛蛙肠粘膜的优势菌, 分别占总菌群数量的 78% 和 20%, 厚壁菌门 (Firmicutes) 约占 1%; DN 组中, 变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和梭杆菌门 (Fusobacteria) 为牛蛙肠道内容物中的优势菌, 分别占总菌群的 76%、15% 和 5%, 放线菌门 (Actinobacteria) 约占 1%。在属分类水平 (见图 3) 上, DC 组中菌群组成表现出高度相似性, 其中梭杆菌门 (Fusobacteria) 的鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、变形菌门 (Proteobacteria) 的埃希氏菌 - 志贺氏菌属 (*Escherichia - Shigella*) 和爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*) 为主要优势菌群, 分别占总菌群比例的 75%、3% 和 2% 左右; DN 组菌群组成在属分类水平上未显示出明显规律。

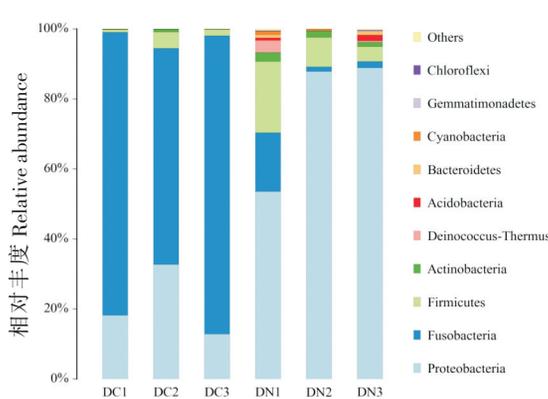


图 2 各样品间门水平物种分布柱状图

Fig.2 Relative abundance of the dominant bacterial phyla in different samples

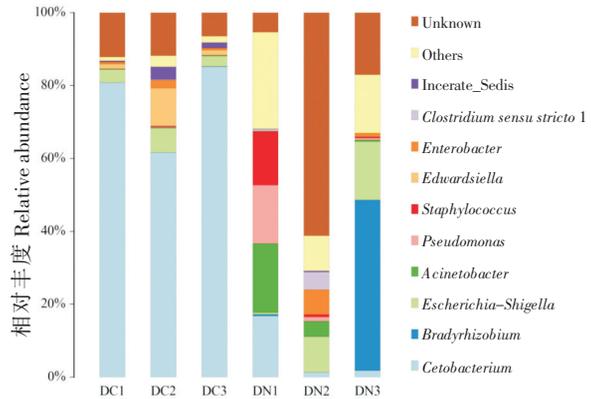


图 3 各样品间属水平物种分布柱状图

Fig.3 Relative abundance of the dominant bacterial genus in different samples

2.4 牛蛙肠粘膜及肠腔内容物微生物样品 PCA 分析

样品微生物 PCA 分析 (见图 4) 显示, PC1 成分贡献率为 70.57%, PC2 成分贡献率为 19.00%, 2 种成分的累计贡献率已达 89.57%, 能反映样本的大部分信息, 表明通过 PCA 分析可以较好区分样品。其中肠粘膜样品 DC 主要分布在二、三象限交界处, 且 3 组样品相对聚集; 肠道内容物 DN 的 3 组样品分散在一、四象限中, 且彼此间间距较大。表明经过 56 d 饲养后, 牛蛙肠粘膜上微生物组成基本稳定, 且与肠腔内容物微生物组成存在明显差异。

2.5 组间样品 LDA 值分布

组间样品的 LDA 值分布见图 5。进化分支图由内至外辐射的圆圈代表了由门至种的分类级别, 在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类, 小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比, 而着色原则为将无显著差异的物种统一着色为黄色, 其他差异物种按该物种所在丰度最高的分组进行着色。结果显示, DC 组与 DN 组微生物相对丰度存在显著差异 (LDA 值 >4) 的菌群, 分属于三个门类, 分别为变形菌门的 γ 变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 和 α 变形菌纲 (Alphaproteobacteria), 梭杆菌门的梭杆菌纲 (Fusobacteriia) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 的芽孢杆菌纲 (Bacilli)。其中, 在属水平上, DC 组中鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、埃希氏菌-志贺氏菌属 (*Escherichia - Shigella*) 和爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*) 相对丰度高于 DN 组; DN 组中的不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 相对丰度高于 DC 组。

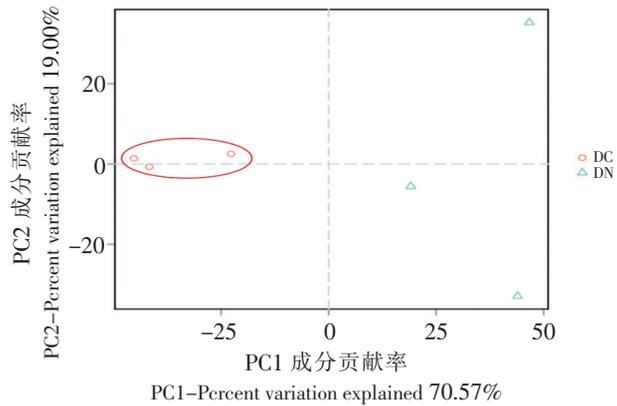


图 4 牛蛙肠粘膜及肠腔内容物微生物样品 PCA 分析图
Fig.4 Principal coordinate analysis of bacterial community composition among different samples

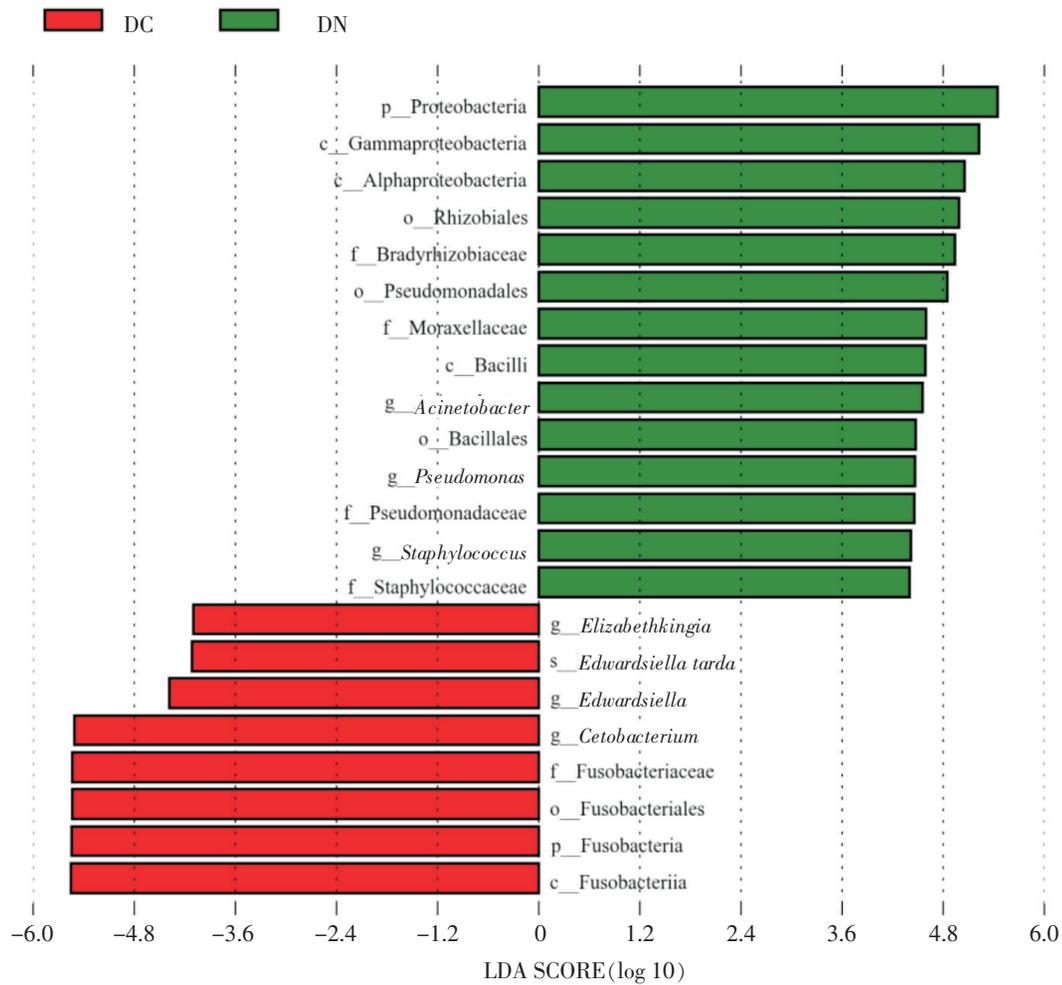


图 5 LDA 值分布柱状图

Fig.5 The dominant bacteria with higher LDA score than 4.0 between two groups

3 讨论

动物肠道微生物是一个复杂的微生态系统。随着对肠道微生物功能研究的逐渐深入,许多研究表明肠道微生物能够参与并影响宿主营养代谢和免疫调节^[3,5,20],因此在动物生理研究,尤其是营养代谢的研究中,必须充分考虑肠道微生物的作用。以往的研究结果表明,水生动物的饲料组分是影响其肠道微生物组成的重要因素之一^[21],如摄食豆粕饲料的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*),其肠道中存在高比例的厚壁菌和变形菌^[22];摄食豆粕饲料的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和鲫鱼 (*Carassius auratus*),肠道中存在高比例的厚壁菌和变形菌,并且鲫鱼肠道还存在高比例的梭杆菌^[23];摄食豆粕饲料的金头鲷 (*Sparus aurata*),其肠道存在高比例的厚壁菌、放线菌^[24]。本次试验结果显示,摄食全豆粕蛋白的牛蛙,其肠道主要优势菌群为梭杆菌、变形菌以及厚壁菌,这与以往对摄食豆粕蛋白的鱼类肠道微生物研究结果是一致的,并且与王纯等^[25]对草食性的草鱼及团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肠道微生物研究结果相似,均以变形菌门及厚壁菌门细菌为肠道优势菌种,相似的结果也在赵晗旭^[26]对陆地草食性动物的研究中有报道,暗示此门类细菌在肠道中的优势存在可能与摄食植物性蛋白源有关。

以往的研究^[23]表明,水产动物肠腔内容物与肠粘膜中的微生物组成存在一定的相似性,并且都受外源环境(水、饲料等)微生物的影响,但同时宿主本身对肠粘膜定植菌种有一定的选择作用^[23]。本次试验中,微生物组成结构图显示,牛蛙肠腔内容物中优势菌种门类为变形菌门(76%)、厚壁菌门(15%)和梭杆菌门(5%);牛蛙肠粘膜样品中优势菌种门类为梭杆菌门(78%)和变形菌门(20%);LDA值分布显示,牛蛙肠腔内容物中变形菌门的菌丰度显著高于肠粘膜组,表明摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠腔内容物中优势菌为变形菌,且多数不能在牛蛙肠粘膜上定植。王程程等^[9]研究表明变形菌门类细菌是饲料和养殖水体中最优势菌种,而牛蛙肠腔内容物主要由未被完全消化的食物残渣组成,牛蛙的进食行为会将饲料及水体中携带的微生物带入到肠腔中,这可能是在牛蛙肠腔内容物中检测出大量变形菌的主要原因,而摄食等行为带来的外源微生物只有小部分能在肠粘膜上定植^[27],导致肠腔内容物中最优势存在的变形菌在肠粘膜上不显最优势性,这与以往的研究结果是一致的。

本次试验结果显示:牛蛙肠粘膜上最优势菌门为梭杆菌门,且其丰度显著高于肠腔内容物中的该菌,表明该门类菌受外源环境影响较小,可以在肠粘膜上定植;在属分类水平,梭杆菌门下鲸杆菌属是最优势菌种。以往研究表明,在人类、大熊猫、牛以及硬骨鱼^[15-16]体内缺乏内源性纤维素消化酶基因,因此其对纤维素的消化主要依靠肠道内与纤维素降解相关的菌群;Parma等^[24]研究发现,当金头鲷饲料中植物纤维成分增加时,其肠道中具消化纤维素能力的菌群会增多;Wu等^[28]研究发现,草鱼肠道中优势菌群为梭杆菌门细菌,其具有降解植物纤维、促进碳水化合物的发酵和能量转换的功能,可提高植物成分消化率;文献[16,29]研究表明,梭杆菌门下鲸杆菌属细菌在淡水草食性、杂食性和滤食性鱼类肠道中为常见优势菌,具有发酵多肽、碳水化合物的能力,还可以产生维生素B₁₂,被认为是一种具益生作用的菌种。本次试验结果还显示,当牛蛙摄食富含植物纤维成分的豆粕饲料时,其肠粘膜上会定植大量梭杆菌门及其门下鲸杆菌属细菌,这些菌种与碳水化合物及纤维素消化相关,可以帮助宿主消化并利用植物性蛋白,这可能是Zhang等^[18]发现牛蛙对饲料中植物性原料有较高利用率的原因之一。

PCA分析结果显示,经过56d养殖试验后,肠粘膜样品间的微生物组成相似度较高,而肠道内容物样品的微生物组成相似度较低。这表明:当牛蛙适应养殖条件和环境时,其肠腔内容物微生物组成容易受到外源微生物影响,个体间差异也较大,而肠粘膜微生物菌群结构达到动态平衡后更为稳定,受个体差异影响较小,更适合用于研究饲料对牛蛙肠道微生物组成的影响。

埃希氏菌-志贺氏菌属和爱德华氏菌属是水产动物常见致病菌,能够导致水产动物腹泻、腹水及败血症等疾病^[30-32]。以往研究认为,豆粕中的抗营养因子能够破坏肠道组织结构,影响营养成分吸

收利用,是引起水产动物肠道炎症的主要原因之一^[33-34]。本实验结果显示,饲喂牛蛙全豆粕蛋白饲料,其肠道粘膜上会定植一定比例的埃希氏菌-志贺氏菌属和爱德华氏菌属细菌,这两类菌均为条件致病菌,在特定条件下,会引发宿主肠道疾病,这或许是植物蛋白替代鱼粉后,动物肠道炎症发生的原因之一。

本次实验中,牛蛙肠道内容物的微生物丰度指数和多样性指数均大于肠粘膜,但不显统计学差异($P > 0.05$),其原因可能是本次试验中将多个采集样品混作一个样品进行检测,造成最终统计样本不足,因此统计学差异不显著,应在今后研究中避免此类问题。本次试验显示,摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠粘膜上会定植与碳水化合物及纤维素消化相关的梭杆菌门和鲸杆菌属细菌,后续将对牛蛙饲料中豆粕的添加比例对肠粘膜上该门类细菌数量的影响进行研究,从而进一步揭示肠道微生物对牛蛙营养代谢的影响。

4 结论

本次试验结果表明摄食全豆粕蛋白饲料的牛蛙肠粘膜上会定植大量与碳水化合物及纤维素消化相关的梭杆菌门及其门下鲸杆菌属细菌,这可能是牛蛙对植物性原料有较高利用率的原因,但同时高水平豆粕也存在引起牛蛙肠道疾病的潜在风险。

[参 考 文 献]

- [1] RAY A K, GHOSH K, RINGØE. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(5): 465-492.
- [2] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2): 121-131.
- [3] 朱伟云,余凯凡,慕春龙,等. 猪的肠道微生物与宿主营养代谢 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(10): 3046-3051.
- [4] KOHL K D, WEISS R B, DALE C, et al. Diversity and novelty of the gut microbial community of an herbivorous rodent (*Neotoma bryanti*) [J]. *Symbiosis*, 2011, 54(1): 47.
- [5] 马晨,张和平,刘彩虹,等. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(4): 852-862.
- [6] 邢孟欣. 养殖大菱鲆肠道微生物多样性及功能分析 [D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013.
- [7] 黄丽丽,张艳,周红,等. 基于16S rRNA高通量测序方法比较新疆冷水鱼肠道中微生物多样性 [J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 138-143.
- [8] 王程程,鄢庆彬,黄伟卿,等. 福建三沙湾养殖大黄鱼肠道菌群研究 [J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2014, 19(1): 1-6.
- [9] 王程程. 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肠道细菌分子生态学研究 [D]. 厦门:集美大学, 2014.
- [10] 石焱. 水雍菜浮床养殖模式下黄颡鱼肠道及环境微生物多样性的研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2015.
- [11] 史秀清,王印庚,张正,等. 大菱鲆仔稚鱼发育早期肠道菌群结构形成的影响因素 [J]. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 1075-1083.
- [12] 唐杨,刘文亮,宋晓玲,等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响 [J]. *水产学报*, 2017, 41(5): 766-774.
- [13] 刘文亮,许华,唐杨,等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 生物膜对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 87-95.
- [14] ZHANG C, FENG W, WANG L, et al. Optimal dietary methionine requirement of bullfrog *Rana (Lithobates) catesbeiana* [J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 576-581.
- [15] SAHA S, ROY R N, SEN S K, et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. *Aquaculture Research* <http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- search, 2006, 37(4): 380-388.
- [16] 刘寒. 基于基因组学的团头鲂植食性机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [17] 方卫东, 鲁康乐, 张春晓, 等. 豆粕替代鱼粉对牛蛙生长、体组成、消化酶活力及肝脏生化指标的影响 [J]. 水产学报, 2016, 40(11): 1742-1752.
- [18] ZHANG C, HUANG K, WANG L, et al. Apparent digestibility coefficients and amino acid availability of common protein ingredients in the diets of bullfrog, *Rana (Lithobates) catesbeiana* [J]. Aquaculture, 2015, 437: 38-45.
- [19] 曾秋辉, 王玲, 陈佳, 等. 牛蛙对几种动物性饲料原料的表观消化率 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2017, 22(6): 9-16.
- [20] 翟齐啸, 田丰伟, 王刚, 等. 肠道微生物与人体健康的研究进展 [J]. 食品科学, 2013, 34(15): 337-341.
- [21] 钟蕾, 向建国, 曾丹, 等. 饵料对鳃肠道微生物多样性的影响 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 830-835.
- [22] DESAI A R, LINKS M G, COLLINS S A, et al. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2012, 350-353(2): 134-142.
- [23] 黄光祥. 养殖鱼肠道菌群分子生态的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [24] PARMA L, CANDELA M, SOVERINI M, et al. Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels [J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 222: 204-216.
- [25] 王纯, 倪加加, 颜庆云, 等. 草鱼与团头鲂肠道菌群结构比较分析 [J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 868-875.
- [26] 赵晗旭. 不同野生动物肠道微生物多样性分析及功能初步研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [27] GAJARDO K, RODILES A, KORTNER T M, et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30893.
- [28] WU S, REN Y, PENG C, et al. Metatranscriptomic discovery of plant biomass-degrading capacity from grass carp intestinal microbiomes [J]. Fems Microbiology Ecology, 2015, 91(10): 370-372.
- [29] 胡俊. 肠道粘附菌群稳态作为鱼类健康评估指标的探究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [30] 孙宗科, 张伟, 鲁波, 等. 水中活的非可培养状态痢疾志贺菌荧光定量 PCR 检测方法研究 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(7): 590-592.
- [31] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病 (综述) [J]. 河北科技师范学院学报, 2004, 18(3): 70-76.
- [32] 水产养殖动物常见细菌性疾病及防治 [J]. 渔业致富指南, 2016(19): 66-67.
- [33] 高美云, 张通, 刘宾, 等. 豆粕抗营养因子及其生物改性的研究 [J]. 中国饲料, 2010(3): 37-41.
- [34] BARROWS F T, DAJ S, HARDY R W. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2007, 265(1/2/3/4): 244-252.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)