

DOI: 10.12264/JFSC2024-0068

长江鲟早期发育阶段肠道菌群塑造机制

田甜, 张建明, 朱欣, 张德志, 胡亚成

中国长江三峡集团有限公司中华鲟研究所, 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443100

摘要: 为探究人工养殖条件下长江鲟(*Acipenser dabryanus*)早期发育过程中的肠道菌群塑造机制, 通过高通量测序技术, 开展长江鲟早期发育阶段肠道菌群与生物饵料水蚯蚓的微生物群落结构特征及相关性分析。结果显示, 在门分类水平, 长江鲟未开口摄食阶段肠道优势菌门以变形菌门(Proteobacteria)为主, 开口摄食第 10~40 天期间以变形菌门和厚壁菌门(Firmicutes)为主。在属分类水平, 未开口摄食至开口摄食第 20 天期间肠道菌群较为单一, 潘多拉菌属(*Pandora*)占比绝对优势地位, 占比超过 88%; 开口摄食第 30 天, 长江鲟肠道菌群发生重组, 物种丰富度和多样性达到峰值, 主要优势菌属变为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)。Procrustes 分析显示, 开口摄食第 40 天长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落组成趋于一致性, 呈现极显著相关($P<0.01$)。进一步通过 SourceTracker 物种来源分析发现, 长江鲟肠道微生物群落中开口摄食第 10 天有 18.97%来源于生物饵料水蚯蚓, 开口摄食第 20 天下降至 0.15%, 开口摄食第 30 天上升至 51.22%, 而在开口摄食第 40 天高达 97.55%。本研究表明, 采用生物饵料水蚯蚓投喂长江鲟, 开口摄食第 30 天是其早期发育阶段肠道菌群的转折点, 肠道菌群特征发生改变, 由高度的保守性转变为良好的可塑性。继续投喂至第 40 天, 其肠道菌群与生物饵料微生物群落表现出高度的一致性。研究结果为长江鲟早期发育阶段肠道菌群调控和健康养殖提供了参考依据。

关键词: 长江鲟; 高通量测序; 早期发育; 肠道菌群; 生物饵料

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)05-0546-11

长江鲟又称达氏鲟, 是我国特有淡水定居性鱼类^[1]。近年来, 由于环境污染、过度捕捞、生境破坏等因素的影响, 其自然种群资源急剧下降。2022 年 7 月, 世界自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature, IUCN)宣布长江鲟野外种群灭绝^[1]。因此, 长江鲟迁地保护、种群梯队建设以及增殖放流对该物种的保护具有重要意义。随着长江鲟繁育规模的扩大, 苗种成活率成为该物种人工养殖过程中的关键因素。研究表明, 在鱼类早期发育阶段, 肠道菌群参与了机体的免疫调节, 同时在抵抗病原菌入侵方面也发挥了显著的作用^[2-3]。

肠道菌群被称作宿主的“第二基因组”^[4],

在机体生长发育、消化吸收、能量利用、免疫调节、屏障效应、健康维持等方面具有极其重要的作用^[5-8]。研究发现, 硬骨鱼类最初的营养来自于卵黄囊^[9], 随着卵黄囊的消耗和摄取外界食物, 肠道随之发育成熟^[10]。未开口摄食前, 鱼类肠道菌群丰度较低^[11]; 当开口摄食后一段时期内, 鱼类肠道菌群数量急剧增加, 逐步形成最初的肠道菌群结构^[12]。因此, 在鱼类早期发育阶段开展肠道菌群研究, 既可以了解微生物菌群在肠道的定植种类及规律, 又可以为健康养殖和疾病防控提供新的思路。然而, 目前长江鲟肠道微生物的研究主要集中在不同饵料、不同营养元素以及污染物对肠道菌群结构的影响^[13-15]。有关长江鲟早期

收稿日期: 2024-03-07; 修订日期: 2024-04-28.

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(2023AFB989).

作者简介: 田甜(1984-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为中华鲟、长江鲟等长江珍稀鱼类病害. E-mail: cocotian1234@126.com

发育阶段(初孵仔鱼至50日龄)肠道菌群结构的研究还鲜有报道。本研究以人工繁育的长江鲟为研究对象,对早期不同发育阶段的长江鲟稚幼鱼进行取样,并对同一时期的饵料样品进行采集。采用高通量测序技术,研究二者之间的菌群结构及其相关性,解析人工养殖条件下长江鲟早期发育阶段肠道菌群的形成机制及影响因素,以期为长江鲟的健康养殖提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用长江鲟由中华鲟研究所2023年春季自主繁育。2023年4—6月在直径2 m、水深0.4 m的圆形流水养殖池饲养。初孵长江鲟仔鱼于12日龄开始投喂水蚯蚓(鲜活,购自当阳市东恒水产养殖中心),持续到第52日龄。每日投喂3~4次,日投喂量为鱼体质量的6%~12%。每次投喂30 min后排污,换水量约为50%。养殖期间水质指标如下:水温16.0~18.0℃,溶解氧>7.5 mg/L,氨氮<0.1 mg/L,亚硝酸盐<0.05 mg/L。

1.2 样品采集

在第10、22、32、42和52日龄,随机采取18尾长江鲟(3尾长江鲟混为一组,设置6个平行),分别代表未开口摄食阶段、开口摄食第10、20、30和40天。肠道样品采集方法为:将长江鲟用无菌水冲洗3遍,用75%酒精棉球擦拭肛门及周围皮肤,用无菌解剖剪从腹部剪开,取出肠道,用无菌PBS冲洗3遍后置于2 mL无菌EP管中,于-80℃保存备测。同时,采集当天投喂的水蚯蚓,具体方法为:将投喂的水蚯蚓置于无菌培养皿中,用无菌水冲洗3遍,称取1 g置于2 mL无菌EP管中,于-80℃保存备测,设置6个平行。

1.3 高通量测序

采用Fast DNA[®]Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)试剂盒分别提取肠道和水蚯蚓总DNA,提取到的DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测其合格性。使用338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')通用引物对16S rRNA基因的V3~V4变异区进行PCR扩增。PCR反应条件如下:95℃ 3 min;

95℃ 30 s; 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 29个循环; 72℃ 10 min。PCR产物经回收、纯化等处理后,通过上海美吉生物医药科技有限公司的Illumina Miseq PE300平台进行高通量测序。

1.4 数据处理

在美吉生物云平台完成数据处理及生物信息学分析工作。测序获得的原始数据使用fastp (version 0.19.6)和Flash (version 1.2.11)进行质控和拼接。再采用Uparse (version 11)软件根据97%的相似度对序列进行OTU聚类并剔除嵌合体。然后采用PDR Classifier (version 2.13)软件对每条序列进行物种注释分类,基于Silva (version 138)数据库进行比对注释。按照最小样本序列数对数据抽平处理后,分别利用R语言(version 3.3.1)工具和Mothur (version 1.30.2)软件制作群落柱形图、计算 α 多样性;通过非度量多维尺度(nonmetric multidimensional scaling, NMDS),探索不同样本在多维空间上的差异;采用Procrustes分析揭示不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料微生物群落的相关性;通过SourceTracker软件追踪长江鲟肠道菌群中的微生物来源。

2 结果与分析

共计采集到长江鲟肠道、生物饵料水蚯蚓样品54个,将所有样品经高通量测序和序列优化后,共获得3734413条优化序列,序列平均长度为426~429 bp,覆盖率超过0.99。各样品稀释曲线显示稀释曲线已到达平台期,表明本次测序几乎已覆盖所有的细菌,可真实反映出细菌群落结构和多样性(图1)。

2.1 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落组成分析

在门水平上,长江鲟肠道菌群优势菌门为变形菌门和厚壁菌门(图2)。其中未开口摄食阶段以变形菌门为主,占比99.76%;开口摄食阶段以变形菌门和厚壁菌门为主,变形菌门在开口摄食第40天占比最高(98.43%),在开口摄食第30天占比最低(64.73%);厚壁菌门在开口摄食第30天占比最高(24.79%),在开口摄食第40天占比最低(1.27%)。生物饵料水蚯蚓微生物群落优势菌门以

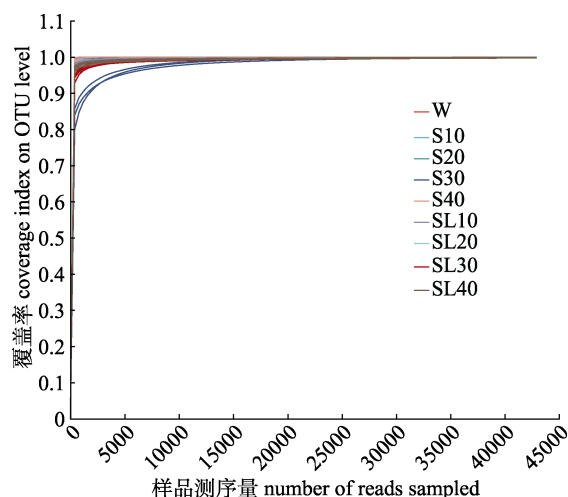


图 1 样品稀释曲线

W、S10、S20、S30、S40 分别表示未开口摄食、开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓。

Fig. 1 Rarefaction curves of different samples

W, S10, S20, S30, and S40 represent the intestine of *Acipenser dabryanus* that have not started feeding, the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively. SL10, SL20, SL30 and SL40 represent the tubificidae of *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively.

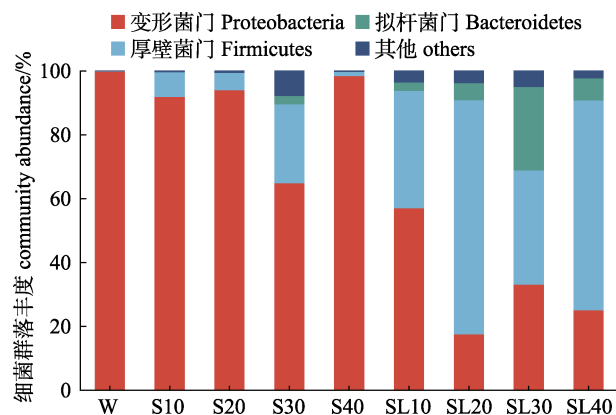


图 2 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群和生物饵料水蚯蚓微生物群落相对丰度和组成(门水平)

W、S10、S20、S30、S40 分别表示未开口摄食、开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓。

Fig. 2 Relative abundance and composition of the intestinal microbiota of *Acipenser dabryanus* and microbial community structure of tubificidae at different breeding stages (at phylum level) W, S10, S20, S30, and S40 respectively represent the intestine of *Acipenser dabryanus* that have not started feeding, the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding. SL10, SL20, SL30 and SL40 represent the Tubificidae fed *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively.

厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门(Bacteroidetes)为主,不同门类的占比在不同投喂阶段有所差异(图 2)。

在属水平上,在未开口摄食至开口摄食第 20 天之间,潘多拉菌属在长江鲟肠道内处于绝对优势地位, 占有肠道微生物的 88.75%~99.48%;在开口摄食第 30 天,长江鲟肠道菌群发生明显变化:潘多拉菌属退出优势地位,菌属种类更加丰富,主要优势菌属调整为柠檬酸杆菌属(35.59%)、乳球菌属(15.42%)、邻单胞菌属(11.46%)、葡萄球菌属(7.47%)、气单胞菌属(5.06%)和克雷伯氏菌属(4.69%);与开口摄食第 30 天相比,第 40 天长江鲟肠道内柠檬酸杆菌属、克雷伯氏菌属和气单胞菌属占比升高,分别由 35.59%、4.69%、5.06%上升至 45.33%、38.96%、5.94%,乳球菌属和葡萄球菌属占比降低,分别由 15.42%、7.47%降低至 1.07%、0.01%,此外还出现了一个新的优势菌属(unclassified_o_Enterobacterales, 6.17%) (图 3)。生物饵料水蚯蚓在整个投喂阶段优势菌属呈现动态变化(图 3),开口摄食第 10 天的优势菌属为柠檬酸杆菌属(49.32%)、乳球菌属(32.83%)和克雷伯氏菌属(3.33%);开口第 20 天的优势菌属为乳球菌属(61.64%)、柠檬酸杆菌属(8.06%)和漫游球菌属(*Vagococcus*, 8.02%);开口第 30 天的优势菌属为乳球菌属(24.77%)、管道杆菌属(*Cloacibacterium*, 23.90%)、沙雷氏菌属(*Serratia*, 13.55%)和柠檬酸杆菌属(6.93%);开口第 40 天的优势菌属为乳球菌属(61.45%)、沙雷氏菌属(13.61%)、柠檬酸杆菌属(5.88%)和管道杆菌属(5.69%)。

2.2 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落 α 多样性分析

选取 Chao 指数和 Shannon 指数表征群落中物种的丰富度和多样性。分别对不同养殖阶段的长江鲟肠道样品和生物饵料样品作上述两项 α 多样性指数分析,结果显示不同样品间的指数差异较大。在长江鲟肠道样品中,Chao 指数呈现先升高后降低的趋势,其中 W 组 Chao 指数最低,显示该时期样品的物种最贫乏;S30 组 Chao 指数最高,且极显著高于其他样品组($P < 0.01$),显示该时期样品的物种最丰富(图 4a)。在长江鲟肠道样品中,

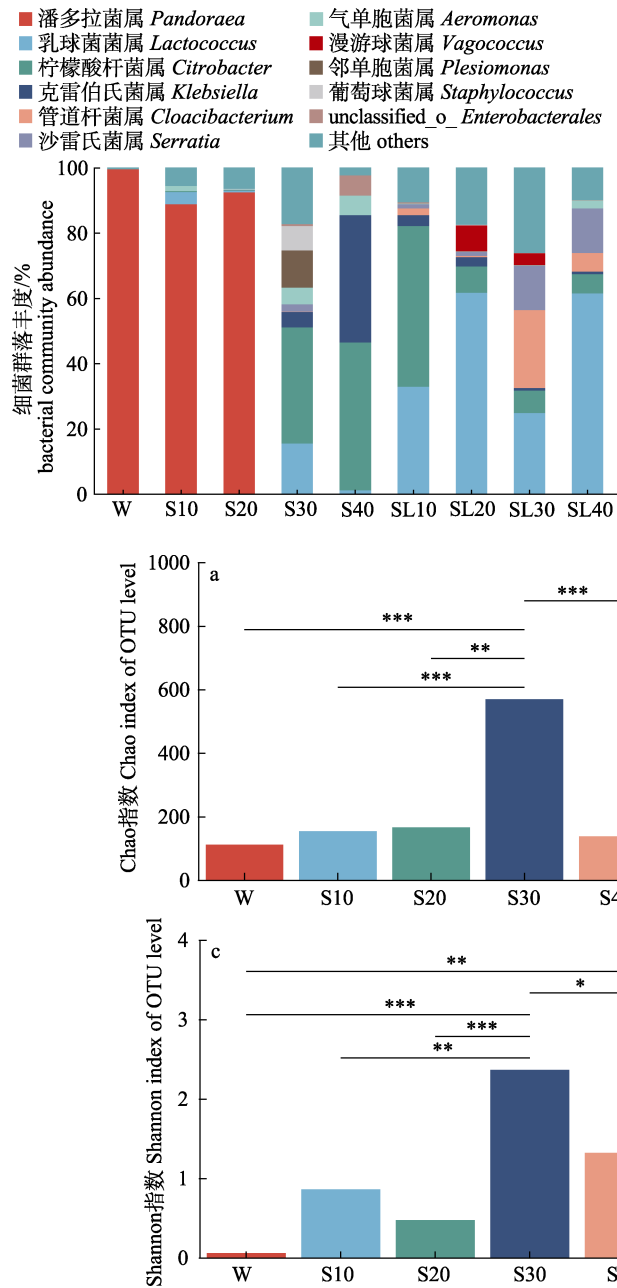


图 4 不同投喂阶段长江鲟肠道和生物饵料水蚯蚓微生物群落 α 多样性分析

*表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$); ***表示在 0.001 水平差异极显著($P<0.001$).

a. Chao 指数(长江鲟肠道, OTU 水平); b. Chao 指数(水蚯蚓, OTU 水平); c. Shannon 指数(长江鲟肠道, OTU 水平); d. Shannon 指数(水蚯蚓, OTU 水平). W、S10、S20、S30、S40 分别表示未开口摄食、开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓.

Fig. 4 Alpha diversity analysis of the intestinal microbiota of *Acipenser dabryanus* and microbial community structure of tubificidae at different breeding stages

* indicates significant different ($P<0.05$); ** indicates extremely significant different ($P<0.01$); *** indicates extremely significant different at 0.001 level ($P<0.001$).

a. Chao index of intestine of *Acipenser dabryanus* at OTU level. b. Chao index of the tubificidae at OTU level. c. Shannon index of intestine of *Acipenser dabryanus* at OTU level. d. Shannon index of the tubificidae at OTU level. W, S10, S20, S30, and S40 respectively represent the intestine of *Acipenser dabryanus* that have not started feeding, the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding. SL10, SL20, SL30 and SL40 respectively represent the tubificidae of *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding.

图 3 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群和生物饵料水蚯蚓微生物群落相对丰度和组成(属水平)

W、S10、S20、S30、S40 分别表示未开口摄食长江鲟肠道、开口摄食第 10 天长江鲟肠道、开口摄食第 20 天长江鲟肠道、开口摄食第 30 天长江鲟肠道、开口摄食第 40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10 天水蚯蚓、开口摄食第 20 天水蚯蚓、开口摄食第 30 天水蚯蚓和开口摄食第 40 天水蚯蚓.

Fig. 3 Relative abundance and composition of the intestinal microbiota of *Acipenser dabryanus* and microbial community structure of tubificidae at different breeding stages (at genus level) W, S10, S20, S30, and S40 represent the intestine of *Acipenser dabryanus* that have not started feeding, the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively. SL10, SL20, SL30 and SL40 represent the tubificidae fed *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively.

Shannon 指数在呈现先升高后降低的交替变化趋势,其中 W 组 Shannon 指数最低,显示该时期样品的多样性最低;S30 组 Shannon 指数最高,且显著高于其他样品($P<0.05$),显示该时期样品的多样性最高(图 4c)。在生物饵料水蚯蚓样品中,SL30 组和 SL40 组样品 Chao 指数显著高于 SL10 组和 SL20 组样品($P<0.05$,图 4b);Shannon 指数在 SL10~SL40 组中呈现先上升后下降的趋势,在开口投喂第 30 天达到峰值(图 4d)。

2.3 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落 β 多样性分析

通过评估 β 多样性,以量化不同投喂阶段长

江鲟肠道菌群和生物饵料水蚯蚓微生物群落之间的差异。采用基于 Bray_Curtis 算法的 NMDS 研究各阶段样品间的关系。如图 5a 所示,W 组、S10 组和 S20 组样品聚集在一起,说明三者之间的群落组成较为相似;S30 组、S40 组与 4 组生物饵料样品聚集在一起,表明随着个体的发育与摄食时间的延长,长江鲟肠道菌群组成发生变化,与饵料微生物群落组成趋于相似。样本层级聚类分析结果(图 5b)与 NMDS 排序结果类似,9 组样品可明显分为两大簇,W 组、S10 组和 S20 组样品相互交叉聚为一簇,S30 组、S40 组与 4 组生物饵料样品相互交叉总体聚为一簇。

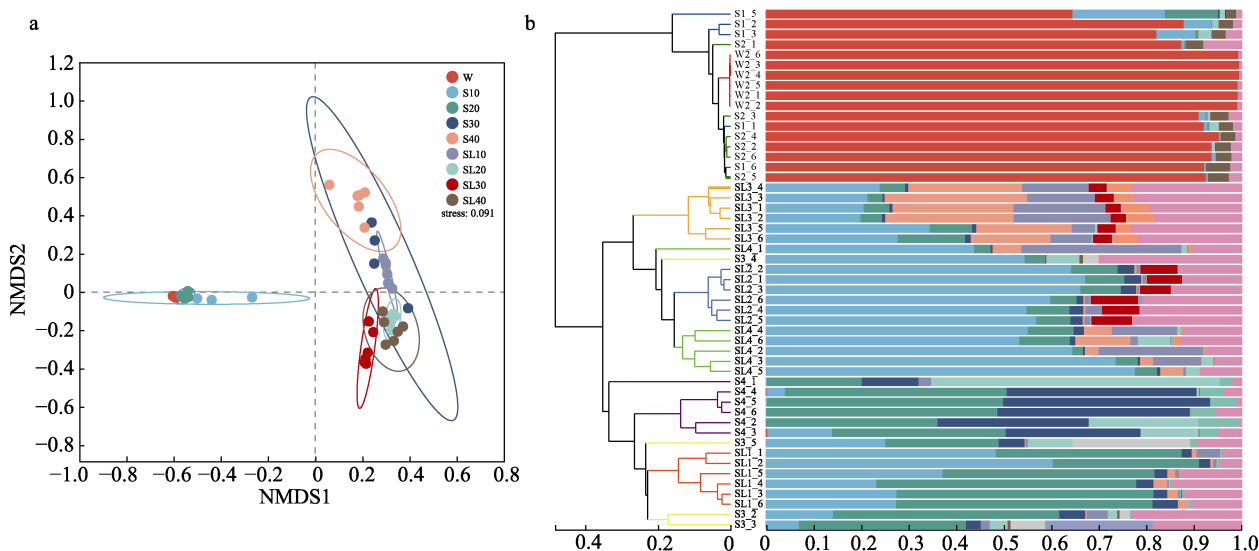


图 5 不同养殖阶段长江鲟肠道和生物饵料水蚯蚓微生物群落 β 多样性分析

a. NMDS 排序图(属水平); b. 层级聚类分析图(属水平). W、S10、S20、S30、S40 分别表示未开口摄食长、开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓。

Fig. 5 Beta diversity analysis of the intestinal microbiota of *Acipenser dabryanus* and microbial community structure of tubificidae at different breeding stages

a. NMDS plot at genus level. b. Hierarchical clustering tree at genus level. W, S10, S20, S30, and S40 respectively represent the intestine of *Acipenser dabryanus* that have not started feeding, the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding. SL10, SL20, SL30 and SL40 respectively represent the tubificidae of *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding.

2.4 不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落的相关性分析

采用 Procrustes 分析用于揭示不同投喂阶段长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落的相关性。结果显示,开口投喂摄食第 10~30 天期间长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微生物群落的相关性不显著($P>0.05$,图 6a、6b、6c);开口摄食第 40 天长江鲟肠道菌群与生物饵料水蚯蚓微

生物群落极显著相关($P<0.01$,图 6d),二者的菌群组成趋于一致性。进一步通过 SourceTracker 物种来源分析追踪不同投喂阶段长江鲟肠道菌群的微生物来源。溯源结果表明, S10 组肠道菌群中有 18.97%来源于 SL10 组(图 7a), S20 组肠道菌群中有 0.15%来源于 SL20 组(图 7b), S30 组肠道菌群中有 51.22%来源于 SL30 组(图 7c), S40 组肠道菌群中有 97.55%来源于 SL40 组(图 7d)。

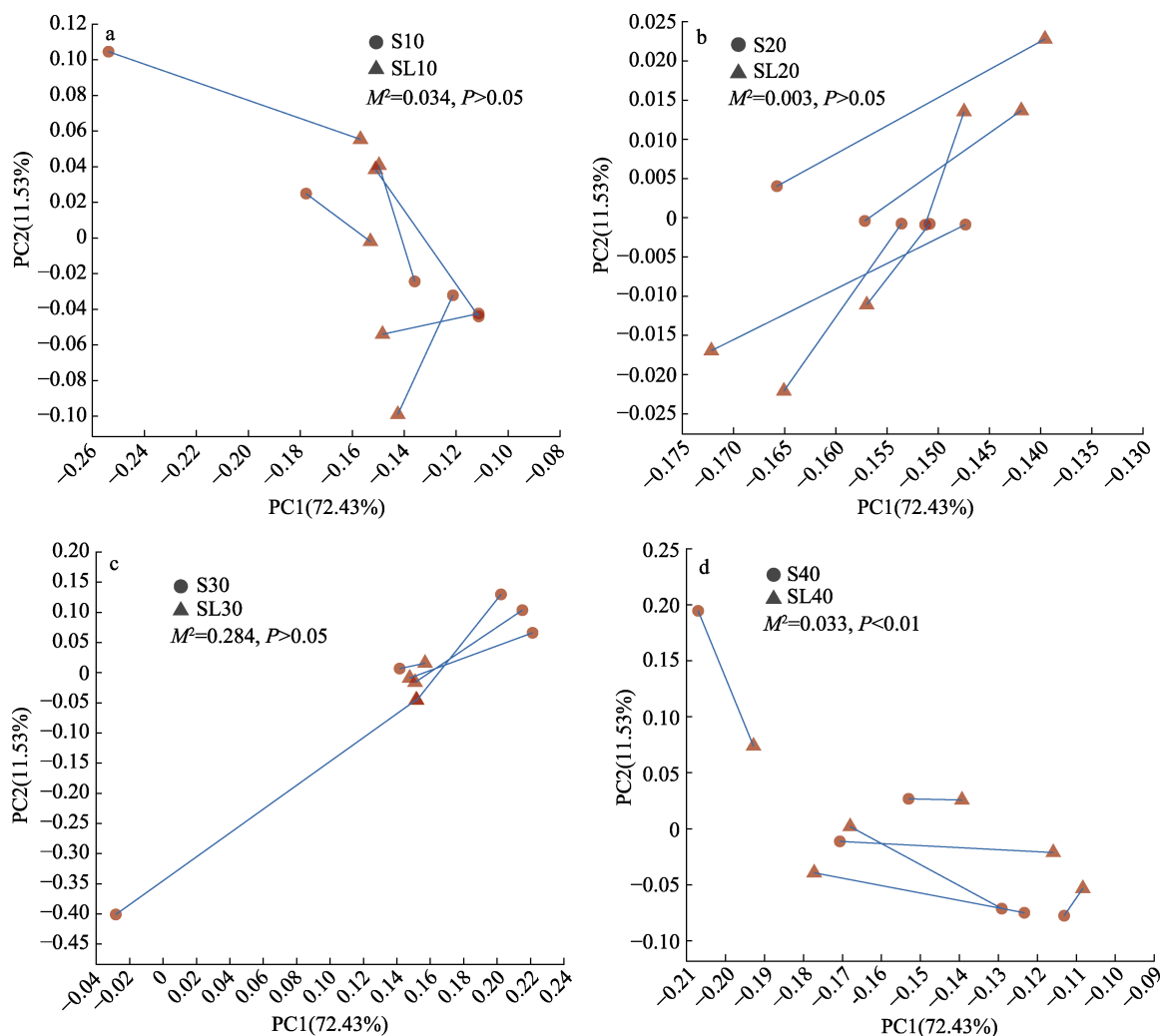


图 6 不同养殖阶段长江鲟肠道和生物饵料水蚯蚓微生物群落之间的 Procrustes 分析

a. S10 vs SL10; b. S20 vs SL20; c. S30 vs SL30; d. S40 vs SL40. S10、S20、S30、S40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓。

Fig. 6 Procrustes analysis of the intestinal microbiota of *Acipenser dabryanus* and microbial community structure of tubificidae at different breeding stages

a. S10 vs SL10; b. S20 vs SL20; c. S30 vs SL30; d. S40 vs SL40. S10, S20, S30, and S40 represent the intestine of *Acipenser dabryanus* at the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively. SL10, SL20, SL30 and SL40 represent the tubificidae fed *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively.

3 讨论

在鱼类的生长过程中, 肠道菌群发挥着极其重要的作用, 与宿主互相协调、和谐一致, 保证机体健康成长。发育阶段和饮食被认为是影响鱼类肠道菌群的主要因素^[16-17]。在对鱼类肠道菌群组成的研究中, 光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*) 仔稚鱼肠道优势菌门为变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门, 幼鱼肠道优势菌门为梭杆菌门

(Fusobacteria)和变形菌门^[18]; 变形菌门在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、梭鲈(*Sander lucioperca*) 肠道中占绝对优势地位, 占比超过 90%^[19-20]; 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼苗肠道主要优势菌门是变形菌门、浮霉菌门(Planctomycetes)和厚壁菌门^[21]。以上研究结果表明, 变形菌门是鱼类早期发育阶段肠道菌群的核心菌门。本研究发现长江鲟未开口摄食阶段肠道优势菌门以变形菌门为主, 占比超过 99%, 开口摄食

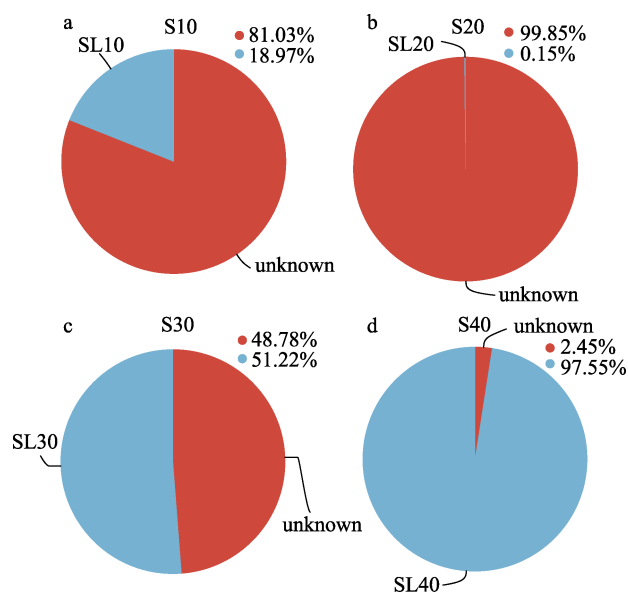


图 7 不同投喂阶段生物饵料水蚯蚓对
长江鲟肠道菌群贡献

a. S10 vs SL10; b. S20 vs SL20; c. S30 vs SL30; d. S40 vs SL40. S10、S20、S30、S40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天长江鲟肠道; SL10、SL20、SL30、SL40 分别表示开口摄食第 10、20、30、40 天水蚯蚓。

Fig.7 The contribution of tubificidae at different breeding stages for the bacteria community in intestine of *Acipenser dabryanus*

a. S10 vs SL10; b. S20 vs SL20; c. S30 vs SL30; d. S40 vs SL40. S10, S20, S30, and S40 represent the intestine of *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively. SL10, SL20, SL30 and SL40 represent the tubificidae-fed *Acipenser dabryanus* on the 10th day of feeding, the 20th day of feeding, the 30th day of feeding, and the 40th day of feeding, respectively.

第 10~40 天期间以变形菌门(占比 64.73%~98.43%)和厚壁菌门(占比 1.27%~24.79%)为主,与上述研究结果相一致。变形菌门是细菌中最大的一个门,门内种类繁多,具有利用碳源,降解有机物,去除氮与磷等作用^[22-23]。厚壁菌门主要作用于糖类和脂类代谢^[24],能够增加宿主肠道上皮细胞营养物质的吸收^[25-26]。开口摄食期间的生物饵料水蚯蚓中厚壁菌门占比 35.78%~73.37%,推测长江鲟开口摄食后肠道中的厚壁菌门主要来源于饵料。

进一步细化到属,研究发现无色杆菌属(*Achromobacter*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)和潘多拉菌属是卵形鲳鲙(*Trachinotus ovatus*)肠

道菌群的优势物种^[24];不动杆菌属(*Acinetobacter*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等是许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)仔、稚、幼鱼肠道中的核心菌群,在鱼类生长过程中呈现先升后降的趋势,在 54 日龄时丰度最高^[27];嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属、无色杆菌属、希瓦氏菌属(*Schlegelii*)是日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)幼体肠道微生物的优势菌群^[28]。而在长江鲟早期发育阶段,本研究发现未开口摄食至开口摄食第 20 天期间肠道菌群较为单一,潘多拉菌属占比绝对优势地位,占比超过 88%。开口摄食第 30 天,长江鲟肠道菌群发生重组,潘多拉菌属退出优势地位,主要优势菌属变为柠檬酸杆菌属、乳球菌属、邻单胞菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属和克雷伯氏菌属。开口摄食第 40 天,主要优势菌属调整为柠檬酸杆菌属、克雷伯氏菌属、unclassified_o_Enterobacterales 和气单胞菌属。不同研究鉴定出的鱼类肠道菌群种类各不相同,这些差异的原因可能与宿主基因型、发育阶段、肠道结构、饮食组成、生存环境等有关^[29-30]。本研究发现潘多拉菌属在长江鲟未开口摄食阶段就已占据主导地位,推测其可能来源于受精卵或养殖环境所携带的细菌,具体来源还需要进一步研究认证。开口摄食早期(摄食第 0~20 天),长江鲟肠道菌群单一,优势物种与未开口摄食阶段相似,虽然摄食了一段时间的水蚯蚓,但开口摄食第 10~20 天期间肠道菌群结构并未发生明显改变,仍然具有高度的保守性;随着长江鲟生长发育和摄食时间的延长,饵料中的部分细菌逐步定植肠道并成为优势物种,在开口摄食第 30 天肠道菌群结构发生重组,原优势物种退出优势地位,细菌种类更加丰富,表现出良好的可塑性。开口摄食第 30 天成为长江鲟早期发育阶段肠道菌群的转折点,其肠道菌群特征发生明显改变,这可能与鲟鱼自身的消化系统发育相关联。徐雪峰^[31]报道中华鲟体内蛋白酶、淀粉酶等各种消化酶在 42 日龄增强到一个峰值,消化系统功能进一步完善。而本研究中长江鲟于 12 日龄开始摄食,开口摄食第 30 天即 42 日龄,其肠道菌群

结构重组时间点与消化系统完善时间点相吻合。

研究发现, 仔稚鱼开口摄食一段时间后, 其肠道菌群的丰富度和多样性会显著增加。李鸣霄等^[19]报道, 第25天大口黑鲈肠道中的微生物丰富度和多样性最高。范梓健等^[21]报道, 采用不同饵料投喂罗非鱼, 肠道菌群丰富度以30日龄的低蛋白饲料组最高, 多样性以30日龄丰年虫组最高。本研究结果与上述研究结果相似, 长江鲟肠道物种丰富度和多样性均在投喂第30天(42日龄)达到峰值。推测产生此现象的原因可能有两个: 一是开口摄食早期消化系统发育不完善, 对营养物质的消化和利用能力不高, 如研究发现中华鲟在10日龄食道、肠道等基本发育完善, 直至第40日龄左右, 其幽门盲囊才能达到发育完善的程度^[31]; 二是随着生长发育和摄食的延长, 其肠道内环境适合更多的微生物黏附和定植。本研究 β 多样性结果显示, 早期发育阶段肠道菌群与生物饵料的微生物群落结构可分为两大类, 其中未开口摄食至开口摄食第20天期间长江鲟肠道菌群组成较为相似, 划分为第一类; 开口摄食第30~40天与生物饵料菌群结构趋于相似, 划分为第二类, 且两类菌群结构可明显区分开来。这提示开口投喂第30天对长江鲟肠道菌群至关重要, 是其物种丰富度和多样性的最高点, 同时也是其物种组成变化的转折点。

食物组成是影响肠道菌群结构的重要因子。邢薇等^[32]在金藻多糖对杂交鲟(*Acipenser baerii* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂)幼鱼肠道菌群的影响研究中发现, 添加金藻多糖可以优化鱼体肠道菌群的结构组成。汤哲等^[33]报道, 在低鱼粉高脂饲料中添加大豆卵磷脂对黄鳝的肠道菌群具有一定的调节作用, 可以在一定范围内控制有害菌和有益菌的丰度, 增加肠道菌群的丰富度和多样性。Yin等^[2]研究发现, 在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)早期发育阶段投喂添加0.10%~0.20%的丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)的饲料, 可以有效提高梭菌的丰度, 降低部分潜在致病菌的丰度。本研究中, 参照李珊珊等^[18]的分析方法采用SourceTracker软件分析追踪不同投喂阶段长江鲟肠道菌群的微生物来源。SourceTracker软件是基

于贝叶斯算法, 探究目标样本(sink)中微生物来源(source)分析。根据source样本和sink样本的群落结构分布, 来预测sink样本中来源于各source样本的组成比例。结果表明, 长江鲟肠道群落中开口摄食第10天有18.97%来源于水蚯蚓, 开口摄食第20天下降至0.15%, 开口摄食第30天上升至51.22%, 而在开口摄食第40天高达97.55%。这说明在长江鲟早期发育阶段肠道菌群的来源主要受到宿主选择压力和饮食因素的影响, 前期宿主选择压力作用大于饮食因素作用, 后期饮食因素作用大于宿主选择压力作用, 具体调控机制还需进一步研究。

4 结论

本研究利用高通量测序技术对长江鲟早期发育阶段肠道菌群与生物饵料水蚯蚓的微生物群落结构及相关性进行研究。结果表明, 采用生物饵料水蚯蚓投喂长江鲟, 开口摄食第30天是其早期发育阶段肠道菌群的转折点, 肠道菌群特征发生改变, 由高度的保守性转变为良好的可塑性。继续投喂至第40天, 其肠道菌群与生物饵料微生物群落表现出高度的一致性。

参考文献:

- [1] Xu L X, Zhou L, Wei Q W. Stock status and conservation dilemma of species of Acipenseriformes in the Yangtze River and relevant suggestions[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(2): 62-72. [许兰馨, 周亮, 危起伟. 长江鲟类资源现状及保护[J]. 水产学报, 2023, 47(2): 62-72.]
- [2] Yin Z Y, Liu Q D, Liu Y T, et al. Early life intervention using probiotic *Clostridium butyricum* improves intestinal development, immune response, and gut microbiota in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 640767.
- [3] Picchietti S, Fausto A M, Randelli E, et al. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax*(L.)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 26(3): 368-376.
- [4] Zhai W Y. The composition and function of the gut and mucosal microbiomes of some Antarctic Notothenioids and surrounding seawaters[D]. Shanghai: Shanghai Ocean Uni-

- versity, 2020. [翟万营. 南极鱼亚目鱼类肠道、皮肤黏液及其生存水环境微生物结构和功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [5] Smith P, Willemsen D, Popkes M, et al. Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish[J]. eLife, 2017, 6: e27104.
- [6] Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish[J]. Cell Host and Microbe, 2012, 12(3): 277-288.
- [7] Gupta V K, Kim M, Bakshi U, et al. A predictive index for health status using species-level gut microbiome profiling[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): article No.4635.
- [8] Wu J F, Xiong J B, Wang X, et al. Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(2): 611-621. [吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. 应用生态学报, 2016, 27(2): 611-621.]
- [9] Hamlin H J, von Herbing I H, Kling L J. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny[J]. Journal of Fish Biology, 2000, 57(3): 716-732.
- [10] Rombout J H W M, Abelli L, Picchiatti S, et al. Teleost intestinal immunology[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 31(5): 616-626.
- [11] Romero J, Navarrete P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)[J]. Microbial Ecology, 2006, 51(4): 422-430.
- [12] Shi X Q, Wang Y G, Zhang Z, et al. Factors that influence intestinal microflora formation in larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 1075-1083. [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.]
- [13] Yang H L, Leng X Q, Du H, et al. Adjusting the prerelease gut microbial community by diet training to improve the post-release fitness of captive-bred *Acipenser dabryanus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: article No.488.
- [14] Wu J P, Yang D Q, Du H, et al. Effects of dietary zinc on the intestinal microbiota composition of juvenile *Acipenser dabryanus*[J]. Freshwater Fisheries, 2021, 51(4): 88-94. [吴金平, 杨代勤, 杜浩, 等. 饲料锌对长江鲟幼鱼肠道微生物组成的影响[J]. 淡水渔业, 2021, 51(4): 88-94.]
- [15] Wu J P, Du H, Wu J M, et al. Effects of dietary Zearalenone on the serum biochemistry, hepatic and intestinal histology, and intestinal microbiota of juvenile Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2021, 37(6): 932-941.
- [16] Wong S, Stephens W Z, Burns A R, et al. Ontogenetic differences in dietary fat influence microbiota assembly in the zebrafish gut[J]. mBio, 2015, 6(5): e00687-e00615.
- [17] Kormas K A, Meziti A, Mente E, et al. Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*)[J]. MicrobiologyOpen, 2014, 3(5): 718-728.
- [18] Li S S, Zhang W J, Gao Y, et al. Correlation between the intestinal microbiota of larval and juvenile *Acrossocheilus fasciatus* and bacterial community of culture water[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(8): 1313-1322. [李珊珊, 张伟佳, 高阳, 等. 光唇鱼仔稚鱼肠道菌群与养殖水体细菌群落的相关性[J]. 水生生物学报, 2023, 47(8): 1313-1322.]
- [19] Li M X, Qiang J, Xu G C, et al. Comparison of gut structure and microbial composition changes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) at different breeding stages[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(9): 5886-5903. [李鸣霄, 强俊, 徐钢春, 等. 不同养殖阶段的大口黑鲈肠道结构和肠道微生物组成变化的比较[J]. 动物营养学报, 2023, 35(9): 5886-5903.]
- [20] Dulski T, Zakęs Z, Ciesielski S. Characterization of the gut microbiota in early life stages of pikeperch *Sander luciopekerja*[J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92(1): 94-104.
- [21] Fan Z J, Zhang Z Y, Cao J M, et al. Effects of different initial feeding on gut microbiota structure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) during early development[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(5): 1032-1042. [范梓健, 张紫玥, 曹建萌, 等. 不同开口饵料对罗非鱼发育早期肠道菌群结构的影响[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(5): 1032-1042.]
- [22] Cottrell M T, Kirchman D L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga*-*Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [23] Klase G, Lee S, Liang S, et al. The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: Implications of environmental public health[J]. Science of the Total Environment, 2019, 649: 1491-1501.
- [24] Lan K P, Wu G D, Wang J, et al. Effects of dietary supple-

- mentation of inulin on survival, growth and intestinal microbiota of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(5): 55-65. [兰鲲鹏, 吴光德, 王珺, 等. 饲料中添加菊粉对卵形鲳鲹幼鱼存活、生长和肠道菌群的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(5): 55-65.]
- [25] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(22): 480-484.
- [26] Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish[J]. Cell Host and Microbe, 2012, 12(3): 277-288.
- [27] Jiang Y, Cao Y N, Liu X Z, et al. Structural characteristics of intestinal microbiota in black rockfish *Sebastes schlegelii* during early life stage[J]. Fisheries Science, 2020, 39(2): 200-208. [姜燕, 曹亚男, 柳学周, 等. 许氏平鲉仔鱼、稚鱼、幼鱼肠道微生物群落结构特征[J]. 水产科学, 2020, 39(2): 200-208.]
- [28] Chang Y J, Tang W Q, Guo H Y. Study on the intestinal microbial community of Japanese eel larvae in the Yangtze River Estuary based on 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(6): 699-710. [常亚娟, 唐文乔, 郭弘艺. 基于 16S rRNA 高通量测序的长江口日本鳗鲡幼体肠道微生物群落研究[J]. 中国水产科学, 2023, 30(6): 699-710.]
- [29] Gou N N, Zhong M Z, Wang K F. Intestinal microbial community of wild and cultured *Onychostoma macrolepi* based on 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2021, 30(7): 963-970. [苟妮娜, 钟明智, 王开锋. 基于 16S rRNA 高通量测序的野生和养殖多鳞白甲鱼肠道微生物群落组成研究[J]. 西北农业学报, 2021, 30(7): 963-970.]
- [30] Dan Y, Yu F Q, Li S, et al. Intestinal microbial diversity of *Micropterus salmoides* at different growth stages[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(12): 2798-2803. [但言, 余凤琴, 李双, 等. 不同生长阶段大口黑鲈肠道微生物多样性研究[J]. 西南农业学报, 2021, 34(12): 2798-2803.]
- [31] Xu X F. Studies on the development of digestive system and enzyme activity of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. [徐雪峰. 中华鲟消化系统的发育及消化酶活性变化的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.]
- [32] Xing W, Xu G L, Li T L, et al. Effect of dietary polysaccharides from *Prymnesium parvum* on growth performance, body composition, serum index and intestinal microflora of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt ♀ × *A. schrenckii* Brandt ♂)[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2023, 41(3): 525-536. [邢薇, 徐冠玲, 李铁梁, 等. 金藻多糖对杂交鲟幼鱼(*Acipenser baerii* Brandt ♀ × *A. schrenckii* Brandt ♂)生长性能、鱼体营养成分、血清指标及肠道菌群的影响[J]. 四川农业大学学报, 2023, 41(3): 525-536.]
- [33] Tang Z, Lin D X, Cai M L, et al. Low-fishmeal and high-fat diet supplement with soybean lecithin on growth, serum biochemical indexes and intestinal flora of rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(3): 361-371. [汤哲, 林东晓, 蔡明浪, 等. 低鱼粉高脂饲料添加大豆卵磷脂对黄鳝生长、血清生化指标及肠道菌群的影响[J]. 水生生物学报, 2024, 48(3): 361-371.]

Mechanism of intestinal remodeling during the early development stage of Yangtze sturgeon, *Acipenser dabryanus*

TIAN Tian, ZHANG Jianming, ZHU Xin, ZHANG Dezhi, HU Yacheng

Institute of Chinese Sturgeon, China Three Gorges Corporation; Hubei Key Laboratory of Three Gorges Project for Conservation of Fishes, Yichang 443100, China

Abstract: To explore the mechanism of intestinal remodeling during the early development of Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*) under artificial breeding conditions, this study applied high-throughput sequencing technology to study the structural characteristics and correlation between the intestinal microbiota and biological feed, Tubificidae, in the early developmental stage of the fish. The results showed that Proteobacteria was the dominant phylum in the intestine of *A. dabryanus* before feeding, and Proteobacteria and Firmicutes were the main bacteria during the 10th to 40th day of feeding. At the genus level, during the period from not feeding to the 20th day of feeding, the intestinal microbiota was relatively singular, with *Pandoraea* occupying an absolute dominant position, accounting for more than 88%. On the 30th day of feeding, the intestinal microbiota of *A. dabryanus* underwent reorganization, with species richness and diversity reaching their peak. The dominant genera became *Citrobacter*, *Lactococcus*, *Plesiomonas*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, and *Klebsiella*. Procrustes analysis showed that, on the 40th day of feeding, the intestinal microbiota of *A. dabryanus* tended to be consistent with the microbial community composition of the biological feed, Tubificidae, showing a highly significant correlation ($P < 0.01$). SourceTracker analysis verified that 18.97% of the *A. dabryanus* intestinal community on the 10th day of open feeding came from the biological feed, Tubificidae. On the 20th day of open feeding, it decreased to 0.15%, and on the 30th day of open feeding, it increased to 51.22%. On the 40th day of open feeding, it reached as high as 97.55%. This study indicated that when feeding *A. dabryanus* the biological feed, Tubificidae, a turning point in the early developmental stage of the intestinal microbiota occurs on the 30th day of feeding. At this time, the characteristics of the intestinal microbiota changed from high conservatism to good plasticity. Continuing feeding until the 40th day, the intestinal microbiota showed a high consistency with the biological feed microbial community. The results provided a reference for the regulation of intestinal microbiota and healthy cultivation of *A. dabryanus* in the early development.

Key words: *Acipenser dabryanus*; high-throughput; early development; intestinal microbiota; biological feed

Corresponding author: TIAN Tian. E-mail: cocotian1234@126.com