

袁锐,方苹,刘训猛,等. 感染鲤疱疹病毒2型对异育银鲫肠道菌群结构的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(21):196-201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.21.036

感染鲤疱疹病毒2型对异育银鲫肠道菌群结构的影响

袁锐¹,方苹¹,刘训猛¹,陈静¹,吴亚锋¹,王晶晶¹,张仁展²,刘肖汉¹

(1. 江苏省水生动物疫病预防控制中心,江苏南京 210036; 2. 江苏省南京市浦口区畜牧水产站,江苏南京 211800)

摘要:为探究异育银鲫感染鲤疱疹病毒2型(Cyprinid herpesvirus 2, Cyhv-2)后对肠道菌群结构的影响,以人工注射方式使试验异育银鲫感染 Cyhv-2,采用16S rRNA基因高通量测序分析对试验异育银鲫肠道菌群的组成和多样性进行了研究。结果显示,感染组鲫鱼肠道菌群 Alpha 多样性及均匀度均低于对照组鲫鱼;感染组与对照组鲫鱼肠道菌群也产生了明显的区别,两者共有的优势菌属仅有2种(鲸杆菌属和假单胞菌属),其中感染组的优势菌属还包括 *Bacteroides*(拟杆菌属)、*Aeromonas*(气单胞菌属)、*Vibrio*(弧菌属)、*Shewanella*(希瓦氏菌属)这样的致病菌属,而对照组中鲫鱼肠道优势菌群未见上述病原菌属,表明 Cyhv-2 感染可改变鲫鱼肠道原有微生态。本研究为感染 Cyhv-2 鲫鱼肠道微生物与宿主的相互影响提供了很好的参考,为鲫鱼造血器官坏死病的防控提供了科学依据。

关键词:鲤疱疹病毒2型;异育银鲫;肠道菌群

中图分类号: S941.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)21-0196-06

已有研究表明,动物肠道内生活着大量而复杂的微生物,包括真核微生物、细菌、古细菌和病毒等^[1-2],在演变和适应过程中逐渐形成了肠道菌群,作为生物体“被遗忘的器官”在生命活动中发挥着重要的作用,它们含有的基因也被称为生物体的“第二基因组”^[3]。近年来,肠道菌群与宿主健康的关系已成为研究热点,鱼类作为一种水生动物,受环境影响和作用,其肠道内亦进化出与所处环境相适应的正常菌群^[4],它们在调节宿主生理生化反

应、促进消化吸收、介导宿主免疫应答和抵御宿主疾病发生等方面发挥着重要的作用,而肠道中的有益菌群可分泌多糖、脂类、维生素、相关活性酶类等一系列代谢产物,共同促进了免疫系统的作用^[5]。

鱼肠道内栖息着大量的正常菌群,它们覆盖在肠道表面黏膜上,形成一道天然拮抗致病菌入侵的机械屏障,同时刺激机体产生非特异性和特异性免疫反应,与宿主共同维持内稳态的平衡,加强对机体的免疫保护^[6]。有研究表明,肠道菌群与宿主间的复杂相互作用始于宿主出生之后,Sugita 等研究发现,罗非鱼 *Oreochromis mossambicus* 仔鱼在孵出 20~60 d 后,肠道内开始有菌群定殖。鱼类肠道菌群的数量和组成,与种类、生长与栖息环境、是否投饵、投饵策略、肠道菌群的数量和组成,这些因素既统一又相互作用^[7]。有研究表明,李学梅等采用 PCR-DGGE 指纹技术研究了斑点叉尾鲷、银鲫和

收稿日期:2020-07-15

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)2027];农业部水生动物重大疫病监测与防治项目。

作者简介:袁锐(1986—),男,江苏南京人,硕士,工程师,主要从事水生动物病原微生物学研究。E-mail:yr8624@163.com。

通信作者:刘肖汉,硕士,高级工程师,主要从事水生动物病害研究。E-mail:1210619123@qq.com。

[6] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂:第9册[M]. 北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1994.

[7] 温秀萍,林青青,杨成梓,等. 药食两用石仙桃资源保护与开发利用[J]. 海峡药学,2015,27(6):46-47.

[8] 邹壮凌,黄平,曾虹婷,等. 药食两用石仙桃生物活性功能的研究进展[J]. 广东化工,2017,44(2):61-62.

[9] 王晓燕,黎理,朱华. 石仙桃研究进展[J]. 亚太传统医药,2016,12(1):42-44.

[10] 刘保财,黄颖桢,赵青云,等. 野生石仙桃立地环境与生长特性研究[J]. 福建农业学报,2017,32(8):864-869.

[11] 凌丹燕,马巧群,吴梅,等. 珍稀药用植物石橄榄的资源调查及栽培技术[J]. 园艺与种苗,2018,38(12):11-12,19.

[12] 姚亮,俞年军,彭代银,等. 不同栽培基质对霍山石斛总多糖含量的影响[J]. 北方园艺,2017(3):155-159.

[13] 张艳玲,王宏权,闻高娜,等. 金线莲栽培基质筛选试验[J]. 热带农业科技,2017,40(1):26-27.

[14] 谢静,许环映,吴建涛,等. 栽培基质对铁皮石斛生长的影响[J]. 热带作物学报,2017,38(1):28-32.

[15] 林丽聪,吴春敏,陈海滨,等. RP-HPLC 法测定石仙桃中天麻素和天麻苷元[J]. 中草药,2008,39(2):283-285.

异育银鲫肠道微生物群落,结果发现,在斑点叉尾鲴肠道中检测到的菌群主要是变形杆菌门,而银鲫和异育银鲫肠道中菌群主要包括梭杆菌门中的类群,还包括变形杆菌门中的气单胞菌,及一些未知的类群^[8]。

鲫鱼(*Carassius auratus*)作为我国重要的淡水养殖鱼类,在江苏、湖北等地养殖产量极高,根据2018年中国渔业统计年鉴显示,仅2017年,全国养殖产量就达282万t,产值高达100亿元。然而,近年来,鲤疱疹病毒2型(CyHV-2)感染引起的鲫鱼造血器官坏死病^[9]严重危害鲫鱼养殖业的健康发展,仅2012年就导致江苏省异育银鲫发病面积3万hm²,发病区域死亡率极高,造成严重的经济损失。目前,有关鲫鱼肠道菌群的研究局限于复合微生物生态制剂对异育银鲫肠道菌群的影响^[10],以及健康鲫鱼肠道菌群的分析^[11-12],关于鲤疱疹病毒2型感染对于鲫鱼肠道菌群的影响研究还未见报道。对此,本研究运用高通量测序,对健康鲫鱼和人工感染CyHV-2鲫鱼肠道菌群进行了比较研究,以期为该病的防治提供肠道微生物方面的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验鲫鱼(体质量80~100g/尾)来自江苏江都溱洋湖水产养殖场,采样前1个月转移至江苏省水生动物疫病预防控制中心室内养殖循环系统,水温控制在22~26℃,期间投喂高蛋白鲫鱼人工配合饲料。驯化3周后选择规格相同的鲫鱼随机分成病毒感染组 and 对照组。病毒感染组鲫鱼通过肌肉注射病鱼组织匀浆液(组织匀浆液需用0.22 μm滤膜过滤除菌),对照组鲫鱼则通过肌肉注射无菌生理盐水(同样要用0.22 μm滤膜过滤除菌)作对照处理。试验4d后,病毒感染组出现明显症状,经分子生物学鉴定,确已感染CyHV-2。随机取3尾感染组鲫鱼和健康组鲫鱼进行后续分析。肠道菌群样品取整个肠道用来提取菌群DNA,样品的具体采集和处理方法参照文献^[13]进行。

1.2 病毒感染组分子生物学鉴定

病毒感染组CyHV-2分子生物学检测参照国标《金鱼造血器官坏死病毒检测方法》(GB/T 36194—2018)中推荐的检测流程和技术参数进行。参照生工生物工程(上海)股份有限公司病毒核酸提取试剂盒说明书提取病毒基因组DNA。以提取

的病毒DNA为模板进行PCR扩增,分别扩增DNA聚合酶基因(362 bp)和解旋酶基因(366 bp)。反应体系如下:Premix Taq™ 25 μL,上下游引物各1 μL(浓度为10 μmol/L),DNA模板为2.5 μL,加ddH₂O 20.5 μL,总反应体系为50 μL;PCR反应程序如下:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃(聚合酶基因)或60℃(解旋酶基因)退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃ 10 min,4℃保存。取扩增产物经琼脂糖凝胶核酸电泳和凝胶成像扫描仪进行检测与分析。

1.3 鲫鱼肠道菌群16S rRNA基因高通量测序分析

样品肠道组织用无菌的剪刀剪碎后,放入2 mL离心管中,加入适量钢珠和800 μL SLX,在破碎仪上进行破碎后提取(具体提取步骤参照OMEGA试剂盒E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit的试剂盒使用说明书,见附录一),提取好后的DNA用琼脂糖凝胶方法检测其完整性。利用Qubit 3.0 DNA检测试剂盒对基因组DNA精确定量,以确定PCR反应应加入的DNA量进行2轮扩增。第一轮扩增步骤如下:30 μL反应体系中包含2×Taq master Mix 15 μL, Bar-PCR primer F(10 μmol/L) 1 μL, Primer R (10 μmol/L) 1 μL,模板DNA 2 μL(20 ng),H₂O 11 μL;第一轮PCR扩增程序如下:94℃ 3 min,后接5个循环(94℃ 30 s,45℃ 20 s,65℃ 30 s),再接20个循环(94℃ 20 s,55℃ 20 s,72℃ 30 s),之后72℃ 5 min。第二轮扩增用第一轮扩增产物作为模板,其余条件一样,程序如下:95℃ 3 min,后接5个循环(94℃ 20 s,55℃ 20 s,72℃ 30 s),之后72℃ 5 min,PCR结束后,PCR产物进行琼脂糖电泳检测回收。对于细菌和古菌扩增的PCR产物和正常扩增片段在400 bp以上的PCR产物,选用0.6倍的磁珠(Agencourt AMPure XP)处理回收。对于真菌PCR产物和其他扩增片段<400 bp的PCR产物,选用0.8倍的磁珠处理回收。利用Qubit 3.0 DNA检测试剂盒对回收的DNA精确定量,以方便按照1:1的等量混合后测序,等量混合时,每个样品DNA量取10 ng,最终上机测序浓度为20 pmol。定量后,使用MiSeq测序平台进行测序,所得到DNA序列分析进行分析,并通过RDP(Ribosomal Database Project)数据库进行比对和OTU分类。

1.4 数据分析

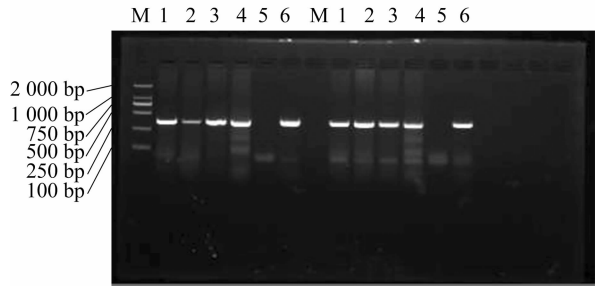
分析过程使用R语言环境和PAST 2.0软件,

其中,R 语言使用了 Vegan、VennDiagram、ggplot 2 和 ggfortify 程序包。进行的主要分析包括:OUT 聚类分析;Alpha 多样性分析,计算 ACE、Chao、Shannon、Simpson、Coverage 等物种多样性指数,并制作所有样品 ACE、Chao、Shannon、Simpson、Richness 指数的箱形图;根据各样本在 OTU 的分布情况绘制韦恩图;样本间菌群丰度差异分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果

病毒感染组的鲫鱼样品在攻毒试验后 1 周内相继发病,呈现典型的鲫鱼造血器官坏死病症状,表现为鳃出血,体表尤其是鳍条基部出血红肿,而对照组鲫鱼健康,无明显症状;取病鱼的鳃、肾、脾、肝等组织提取病毒基因组进行 PCR 检测,获得了片段大小分别为 366 bp 和 362 bp 的特异性条带(图 1),结果均呈 Cyhv - 2 阳性。



M 表示 DL 2000 DNA Marker; 1~4—病鱼的鳃、肾、脾、肝组织; 5—阴性对照, 6—阳性对照
图1 聚合酶基因(左边)和解旋酶基因(右边)特异性 PCR 电泳图

2.2 肠道菌群 OTU 聚类分析

对感染组和对照组各样本的肠道菌群进行基于 Bray - Curtis 方法的 OTU 样本聚类,由图 2 可知,树枝的长度代表样本间的距离,越相似的样本会越靠近,图中同一颜色的树枝表示来源于同一组,对照组(H)和感染组(D)的 3 个样本分别聚在了一起,说明感染 CyHV - 2 后的鲫鱼肠道菌群 OTU 丰度与对照组相比,出现了明显的分化。

OTU 分布韦恩图可以用来统计样本中共有的和独有的 OTU 数目,直观地展现出环境样品的 OUT 数目及重叠情况,感染组和对照组的鲫鱼肠道菌群 OTU 分布韦恩图(图 3)表明,感染组与对照组的共有 OTU 数目仅为 12 个,对照组 3 个样本的 OTU 数达到 929 个,而感染组 3 个样本的 OTU 数仅 541 个,相比对照组减少了 388 个,表明感染 Cyhv - 2 后的鲫鱼肠道菌群 OTU 丰度明显降低。

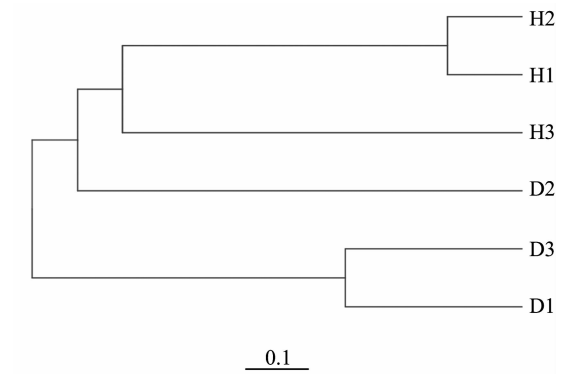
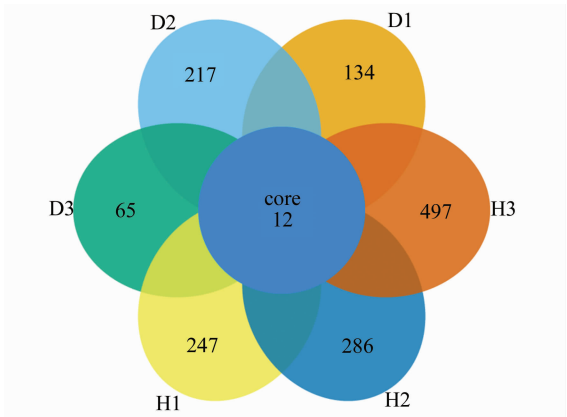


图2 基于 OTU 分析的样本聚类树图



不同样品用不同颜色表示, 图中数字代表特异或共有的 OTU
图3 OTU 样本分布韦恩

2.3 肠道菌群 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性是对样品物种多样性的分析,基于 OTU 结果计算样品的 Alpha 多样性指数,包括估算样品 OTU 数量的 Chao 指数和 ACE 指数以及样品微生物多样性的辛普森指数、香农指数。由图 4 可知,每个盒代表 1 个分组下面所有样本的 Alpha 指数(分别是 Chao 指数、ACE 指数、香农多样性指数、辛普森多样性指数),可以直观地发现每组样本下的多样性指数情况,盒子越窄说明该组内相关多样性指数越低,越宽则说明多样性指数越高。肠道菌群 Alpha 多样性分析结果表明,感染组的 Chao 指数、ACE 指数、辛普森指数、香农指数均低于对照组(图 4),其中,Chao 指数、ACE 指数达到显著差异水平($t - test, P < 0.05$),说明 CyHV - 2 感染使鲫鱼肠道菌群的丰度、多样性、均匀度都明显降低。

2.4 肠道菌群组成及相对丰度分析

首先比较了感染组与对照组鲫鱼肠道微生物在门水平上的组成及相对丰度。结果表明,无论感染组还是对照组,均检测到 23 个菌门(图 5),分别为变形菌门 (Proteobacteria)、梭杆菌门

(Fusobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、糖化细菌门(Candidatus Saccharibacteria)、衣原体门(Chlamydiae)、绿弯菌门(Chloroflexi)、广古菌门(Euryarchaeota)、酸酞菌门(Acidobacteria)、螺旋菌门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、懒杆菌门(Ignavibacterla)、奇古菌门(Thaumarchaeota)、绿菌

门(Chlorobi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、装甲菌门(Armatimonadetes)、Parcubacteria。其中,感染组的优势菌门(图6)为变形菌门(52.06%)、梭杆菌门(31.52%)、拟杆菌门(11.15%)、放线菌门(2.77%),4个优势菌门在感染组鲫鱼肠道菌群中所占比例为97.5%;对照组的优势菌门(图7)为变形菌门(77.88%)、梭杆菌门(15.03%)、浮霉菌门(2.72%)、放线菌门(1.87%),4个优势菌门在对照组鲫鱼肠道菌群中所占比例为97.5%。

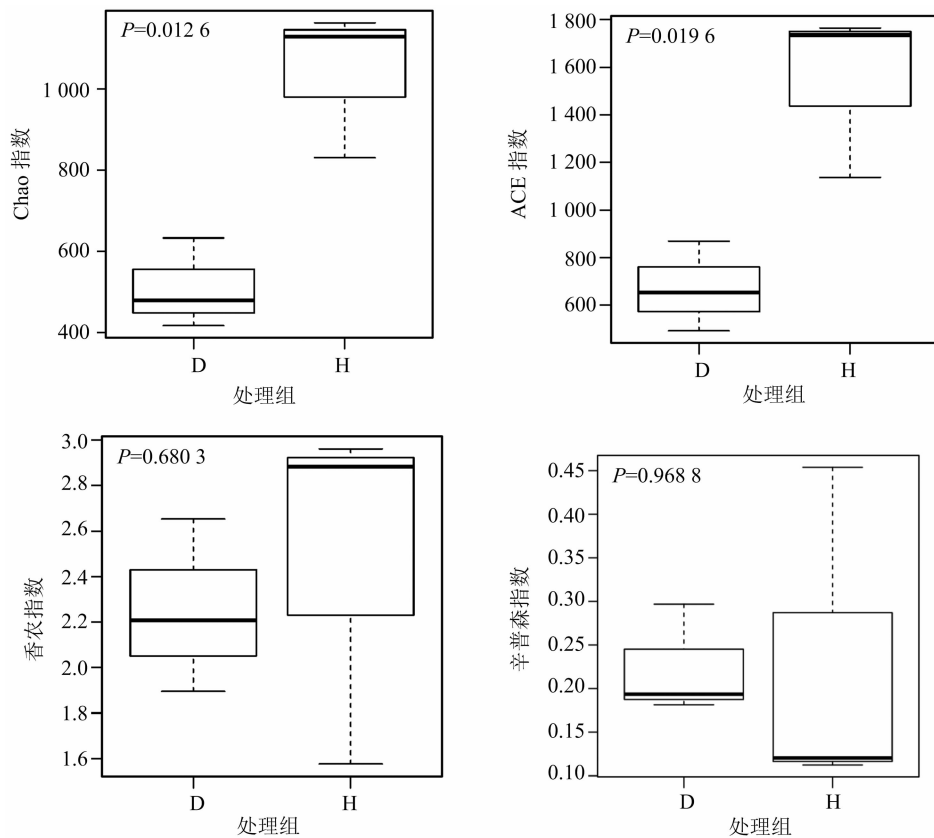


图4 感染组(D)和对照组(H)鲫鱼肠道菌群 Alpha 多样性指数比较

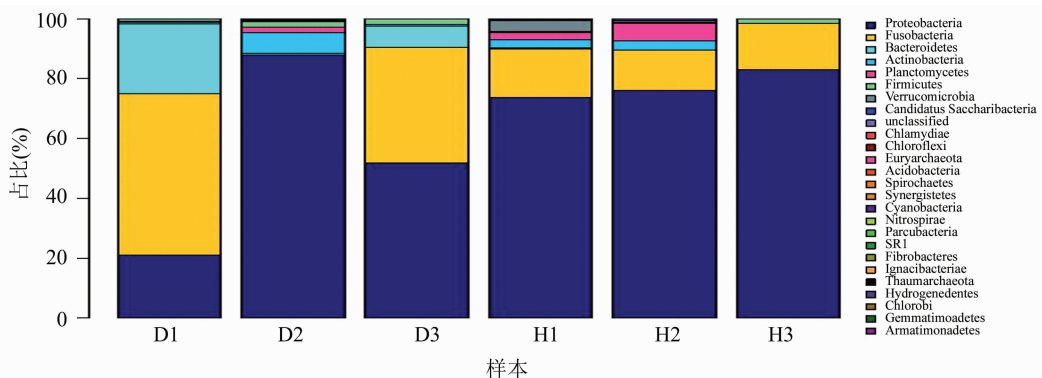


图5 感染组与对照组鲫鱼肠道微生物在门水平上的相对丰度比较

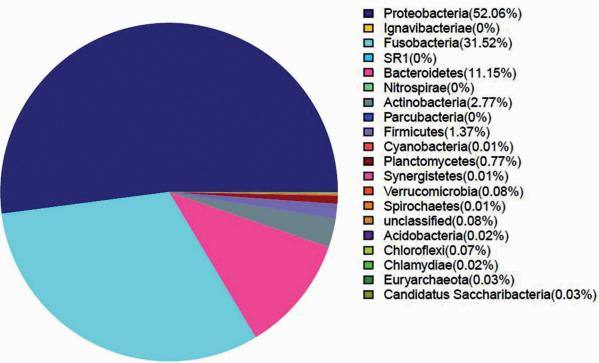


图6 感染组鲫鱼肠道菌群相对丰度

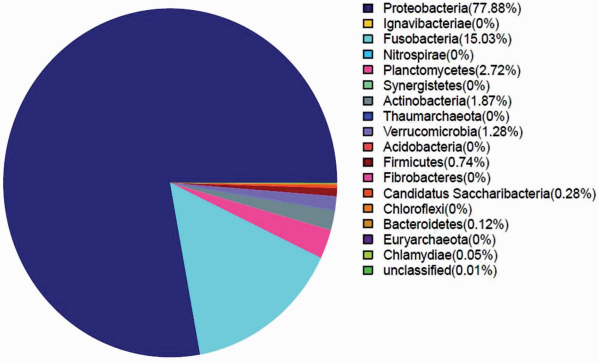


图7 对照组鲫鱼肠道菌群相对丰度

将属水平上主要菌群进行分析(表1)发现,感染组鲫鱼肠道菌群优势菌属有8种,分别是鲸杆菌属(31.39%)、假单胞菌属(22.33%)、拟杆菌属(10.85%)、气单胞菌属(9.72%)、希瓦氏菌属(7.55%)、弧菌属(5.56%)、短波单胞菌属(1.4%)、鞘氨醇单胞菌(1.33%);对照组鲫鱼肠道菌群优势菌群则有10种,分别是柠檬酸杆菌属(23.91%)、芽殖杆菌属(21.28%)、鲸杆菌属(15.03%)、包西氏菌属(11.78%)、根瘤菌属(4.66%)、不动杆菌属(3.49%)、假单胞菌属(3.18%)、水球菌属(1.58%)、艾克曼菌属(1.24%)、红杆菌属(1.18%)。将感染组与对照组优势菌属对比发现,感染组的鲫鱼肠道优势菌群发生明显变化,两者共有的优势菌属仅有2种(鲸杆菌属和假单胞菌属),相对丰度相比对照组也都有所下降。除了共有优势菌属外,感染组和对照组各有6种或8种独有优势菌种,其中感染组的优势菌属还包括拟杆菌属、气单胞菌属、弧菌属、希瓦氏菌属这样的致病菌属,而对照组中鲫鱼肠道优势菌群未见上述病原菌属。分析认为,感染鲤疱疹病毒2型对鲫鱼肠道菌群产生了较为明显的影响,一些常见的肠道菌群被病原菌所取代。

表1 属水平上主要菌群比较

感染组		对照组	
菌属分类	相对丰度(%)	菌属分类	相对丰度(%)
鲸杆菌属	31.39	柠檬酸杆菌属	23.91
假单胞菌属	22.33	芽殖杆菌属	21.28
拟杆菌属	10.85	鲸杆菌属	15.03
气单胞菌属	9.72	包西氏菌属	11.78
希瓦氏菌属	7.55	根瘤菌属	4.66
弧菌属	5.56	不动杆菌属	3.49
短波单胞菌属	1.4	假单胞菌属	3.18
鞘氨醇单胞菌	1.33	水球菌属	1.58
		艾克曼菌属	1.24
		红杆菌属	1.18

3 讨论

鱼类肠道微生物菌群与宿主的免疫等密切相关,有研究表明,鱼肠道表面黏膜上覆盖着大量的正常菌群,从而形成一道天然抵御致病菌侵入的机械屏障^[14]。另有研究发现,鱼类肠道菌群的变化与免疫机能的改变有着密切的联系,李莉等研究表明,随着草鱼肠道中气单胞菌属细菌比例下降而肠杆菌科细菌含量上升时,草鱼白细胞的吞噬百分比和吞噬指数明显上升,说明草鱼肠道优势菌群的变化可能与增强白细胞吞噬活性有关^[4]。因此,维持鱼类肠道正常菌群的动态平衡对宿主生命活动至关重要。

影响肠道菌群组成的因素有很多,水环境、投喂饲料、转基因的应用乃至病原的感染均能对鱼类肠道菌群产生显著影响。涂宗财等研究了水环境中重金属铜对异育银鲫肠道微生物的影响,受到重金属胁迫处理后的异育银鲫肠道微生物多样性明显降低^[15];宦海琳等研究了复合微生态制剂对异育银鲫肠道菌群的影响,证实在饲料中添加适量的复合微生态制剂可有效改善异育银鲫肠道微生态平衡,有益于消化酶的分泌和营养吸收^[10];饶刘瑜等对转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异进行了研究,结果表明,在3个不同的发育时期,转基因组鲤肠道微生物群落组成与对照组鲤鱼相比发生了明显改变^[16];朱文根等研究了感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响,证实 GCRV 的感染可使草鱼肠道微生态发生紊乱,群落丰度与多样性等均明显下降^[17];李东亮等用嗜水气单胞菌感染草

鱼发现,草鱼肠道微生物菌群多样性及优势菌群均发生了明显变化^[18]。

虽然已有研究表明,病原感染可引起水生动物肠道菌群紊乱,但是 Cyhv-2 的感染对鲫鱼肠道菌群的影响尚不清楚。本研究应用高通量测序技术研究了 Cyhv-2 感染对鲫鱼肠道菌群的影响,结果表明 Cyhv-2 的感染使得鲫鱼肠道微生物群落结构产生显著变化,Cybv-2 感染组鲫鱼肠道菌群 Alpha 多样性显著低于对照组鲫鱼,优势菌属亦发生明显变化,病原菌明显增多,说明感染 Cyhv-2 使得鲫鱼肠道微生态系统发生了紊乱。

已有研究表明,变形菌门是鱼类肠道微生物中最主要类群之一^[19],本研究结果显示,无论是感染组还是对照组,变形菌门均是鲫鱼肠道最优势菌门。研究发现,感染组异育银鲫肠道中隶属于变形菌门的气单胞菌属和弧菌属与对照组相比,其丰度呈上升趋势,由于气单胞菌属中的致病性气单胞菌以及弧菌属中的副溶血性弧菌均为鱼类的主要致病菌,因此气单胞菌和弧菌属的数量上升,提示感染 Cyhv-2 后,异育银鲫体内存在混合细菌感染的潜在风险,这为异育银鲫的病毒细菌混合感染提供了理论依据,对于感染 Cyhv-2 后的异育银鲫养殖综合防控提供了理论支撑。

本研究表明,Cybv-2 的感染会引起异育银鲫肠道正常菌群紊乱。肠道优势菌群的改变往往会加剧鱼体免疫力下降,进而加重肠道微生态失衡,导致致病菌过度增殖,从而使鲫鱼遭受细菌激发感染。因此,如果能够在易发病水温来临前,投喂一些易于在异育银鲫肠道定殖的有益微生态制剂,或许可以稳定鲫鱼肠道菌群,从而缓解鲫鱼的病毒细菌混合感染,为缓解鲫鱼造血器官坏死病提供帮助。

参考文献:

- [1] Björkstén B. The gut microbiota: a complex ecosystem[J]. Clinical and Experimental Allergy, 2006, 36(10): 1215-1217.
- [2] 蒋 葛, 沈 辉, 万夕和, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合症病虾与健康虾肠道优势菌群比较分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 142-148.
- [3] 童雨心, 梁迎春. 肠道微生物与人体健康研究进展[J]. 生物技术通讯, 2014(6): 896-900.
- [4] 李 莉. 草鱼肠道菌群的变化和免疫功能的关系[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [5] Han S F, Liu Y C, Zhou Z G, et al. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences[J]. Aquaculture Research, 2010, 42(1): 47-56.
- [6] 宋增福, 吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474.
- [7] Sugita H, Fushino T, Oshima K, et al. Microflora in the water and sediment of freshwater culture ponds[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1985, 51(1): 91-97.
- [8] 李学梅, 余育和, 解绶启, 等. 三种室内饲养鱼类肠道微生物群落 PCR-DGGE 指纹分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 423-429.
- [9] 袁 锐, 陈 静, 刘训猛, 等. 鲤疱疹病毒 2 型研究进展[J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 38-45.
- [10] 宦海琳, 丁 丽, 周维仁, 等. 复合微生态制剂对异育银鲫肠道菌群和消化机能的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 604-610.
- [11] 侯进慧, 陈宏伟, 曹泽虹, 等. 鲫鱼肠道细菌菌群初步分析[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 178-181.
- [12] 陈芳梅, 李 伟, 刘 蔚, 等. 大鼠与鲫鱼肠道内含物中微生物菌群的研究[J]. 实验动物科学, 2019, 36(1): 48-51.
- [13] Wang C, Ni J J, Yan Q Y, et al. Comparison of the intestinal bacterial communities between grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 868-875.
- [14] 孙敬锋, 贾艳丽. 鱼类肠道菌群与免疫调节研究进展[J]. 水产科技情报, 2016, 43(2): 96-100.
- [15] 涂宗财, 庞娟娟, 王 辉, 等. 水环境中重金属铜对异育银鲫肠道微生物的影响[J]. 微生物学报, 2017, 57(7): 1060-1068.
- [16] 饶刘瑜, 李学梅, 李星浩, 等. 转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(2): 349-355.
- [17] 朱文根, 李星浩, 饶刘瑜, 等. 感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 43(1): 109-116.
- [18] Li D L. Study of the intestinal flora structure of grass carp infection with aeromonas hydrophila[D].
- [19] 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.