

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230915002

夏兴龙, 王萃, 周叶青, 等. 诺氟沙星对刺参肠道菌群结构与功能特征的影响[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(2): 12-26

Xia X L, Wang L, Zhou Y Q, et al. Effects of norfloxacin on structure and function of gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(2): 12-26 (in Chinese)

诺氟沙星对刺参肠道菌群结构与功能特征的影响

夏兴龙, 王萃*, 周叶青, 谭八梅, 董昌坤, 张彦敏, 裴泓霖, 丁君

大连海洋大学农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 大连 116023

收稿日期: 2023-09-15 录用日期: 2024-01-29

摘要: 近年来, 诺氟沙星(norfloxacin, NOR)在水环境中被广泛检出。为探究 NOR 对棘皮动物的毒性效应, 选取刺参(*Apostichopus japonicus*)为研究对象, 将其暴露于 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.5\times 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度诺氟沙星中 56 d, 研究 NOR 暴露对刺参肠道菌群结构及功能的影响。结果显示: 刺参肠道核心菌群为变形菌门(Proteobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。与对照组相比, 随着环境中 NOR 暴露浓度的增加, 刺参肠道菌群逐渐被罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)取代, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NOR 处理组罗尔斯通氏菌相对丰度占比高达 79.82%, 呈现出肠道菌群单一化的现象。基于京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)代谢通路数据库注释, NOR 暴露组肠道菌群 mRNA 翻译、蛋白质复制合成及修复、多糖合成及代谢通路丰度显著上调($P<0.05$), 而膜运输、氨基酸代谢通路丰度显著下调($P<0.05$)。综上可知, 水体中 NOR 影响了刺参肠道菌群结构与功能。本研究旨在为水体抗生素生态风险评估提供一定的理论依据。

关键词: 诺氟沙星; 刺参; 肠道菌群; 高通量测序

文章编号: 1673-5897(2024)2-012-15 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Norfloxacin on Structure and Function of Gut Bacterial Community of *Apostichopus japonicus*

Xia Xinglong, Wang Luo*, Zhou Yeqing, Tan Bamei, Dong Changkun, Zhang Yanmin, Pei Honglin, Ding Jun

Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Received 15 September 2023 accepted 29 January 2024

Abstract: In recent years, norfloxacin (NOR) has been widely detected in the aquatic environment. In order to investigate the toxic effects of NOR on echinoderm, the *Apostichopus japonicus* was selected as the research object and exposed to $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.5\times 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ concentrations of NOR for 56 days. The effects of NOR exposure on the structure and function of the gut bacterial community of *A. japonicus* were investigated. The results showed that the core gut bacterial community of *A. japonicus* were Proteobacteria and Verrucomicrobia. Compared with the control group, with the increase of NOR exposure concentration in the environment, the gut bacterial community of *A. japonicus* was gradually replaced by *Ralstonia*, and the relative abundance of *Ralstonia*

基金项目: 辽宁省 2023 年第一批中央引导地方科技发展资金项目(2023JH6/100100022); 国家自然科学基金青年基金项目(31902395); 辽宁省科技厅农业重大专项项目(2023); 大连市青年科技之星项目(2020RQ115)

第一作者: 夏兴龙(2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖微生态, E-mail: 2224172995@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: dlouwangluo@sina.com

in the 150 mg · L⁻¹ NOR-treated group accounted for as high as 79.82%, which showed the phenomenon of homogenization of the gut bacterial community. Based on the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) metabolic pathway database annotation, the abundance of mRNA translation, protein replication synthesis and repair, polysaccharide synthesis and metabolic pathways was significantly up-regulated in the gut bacterial community of the NOR-exposed group ($P < 0.05$), whereas the abundance of membrane transport and amino acid metabolic pathways was significantly down-regulated ($P < 0.05$). In conclusion, NOR in the water affected the structure and function of the gut bacterial community of *A. japonicus*. This study aims to provide some theoretical basis for the ecological risk assessment of antibiotics in water.

Keywords: norfloxacin; *Apostichopus japonicus*; gut bacterial community; high-throughput sequencing

诺氟沙星(norfloxacin, NOR)作为第三代喹诺酮类药物,具有广谱抗菌性且与其他多种抗菌类药物均无交叉耐药性,前些年被广泛应用于水产生物的疾病预防与治疗^[1]。其通过作用于细菌 DNA 螺旋酶的 A 亚单位,抑制 DNA 的合成和复制而导致细菌死亡,进而降低细菌种群密度与信号分子的浓度,抑制包括受体蛋白在内相关蛋白的信号传递,抑制集群信号最终传递到胞内,达到抑制细菌群体感应的目的^[2]。由于其在水产动物体内的生物富集,可通过食物链传递至消费者,可引起人体的耐药性下降,2015 年被我国原农业部列为水产养殖禁用药品^[3]。NOR 在水环境中相对稳定,不易降解。近年来,NOR 在水环境中被广泛检出。已有研究表明,我国沿岸海域水体残留 NOR 浓度范围为 $7.63 \times 10^{-6} \sim 5.93 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4-9]。然而,在水环境中即使残留 NOR 的浓度水平很低($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),也可直接对水生生物产生毒性效应,包括游泳能力下降、消化功能降低、免疫功能受损和肠道菌群紊乱等^[10-14]。

肠道菌群作为机体不可或缺的组成部分,参与与有机物质代谢、营养元素吸收、免疫系统调节等生理活动,在生物体生长发育方面具有积极意义,因其对环境压力具有较强的适应能力而受到广泛关注^[15-16]。已有研究发现,NOR 可以引起水生动物肠道菌群失调及肠道功能下降。例如,NOR 短期暴露显著降低了大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼肠道菌群丰度与多样性并抑制了代谢、细胞防御和信息转导等生理功能^[17]。长期接触 NOR 还可导致鲤鱼(*Cyprinus carpio* Linnaeus)幼鱼肠道菌群稳态被打破,肠道屏障及其他免疫功能受损,进而影响鱼类的肠道健康^[18]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)暴露于 NOR 环境中,其肠道中气单胞菌(*Aeromonas*)、反硝化产碱菌(*Alcaligenes denitrificans*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和肠杆菌(*Enterobacter*)等菌属相

对丰度显著降低,肠道消化酶水平偏低,糖类代谢及氮循环速率减缓,NOR 在一定程度上加重了机体代谢负担^[19]。贻贝(*Mytilus coruscus*)暴露于 NOR 中,其肠道菌群的丰富度和多样性受到显著性抑制,且细胞过程和信号、代谢、信息存储和处理功能受到了显著性影响^[20]。然而,NOR 对于棘皮动物肠道菌群的影响研究则相对较少。

刺参(*Apostichopus japonicus*)是一种具有较高经济价值和药用价值的海洋底栖生物,主要以沉积物中藻类碎片、动植物腐殖质等其他有机碎屑为食^[21]。其消化系统结构简单,无消化腺。肠道是食物消化及营养物质吸收的主要场所,肠道内部细菌可产生多种消化酶,帮助宿主消化、吸收营养物质;部分细菌可通过增强免疫细胞、酶活性提高机体的非特异性免疫能力。此外,肠道固有细菌还可通过占据生态位并分泌抗菌肽形成屏障,以此达到隔离异物及抑制致病菌的效果^[22]。刺参独特的生活环境与摄食习性,使其肠道菌群更易受外界环境的影响^[23]。已有研究表明,抗生素暴露可导致刺参生长、消化及生理免疫功能出现显著变化。例如,Díaz-Díaz 等^[24]评估了长期投喂抗生素治疗对刺参生长和健康的影响,结果发现四环素和红霉素对海参的生长以及脂肪酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶的消化活性均有抑制作用。另外,抗生素喂养的幼参免疫相关参数较低,表明抗生素的使用可能削弱了海参的免疫防御系统。磺胺甲恶唑($1.2 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露 35 d,可导致刺参肠道组织萎缩和生长速率下降,改变肠道菌群结构,显著增加条件致病菌相对丰度,干扰宿主脂质、氨基酸与碳水化合物代谢途径,造成肠道潜在的炎症风险^[25]。环境中过高浓度的氟苯尼考($1.0 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)会打破幼参肠道原有平衡,改变核心菌群组成及丰度,降低生物活性物质的分泌速率,进而可能会影响幼参的消化吸收,并增加致病风

险^[26]。因此,本文选用刺参作为研究对象,利用高通量测序技术,开展 NOR 胁迫对其肠道菌群结构及功能的影响研究,旨在为 NOR 生态风险评估提供一定的理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料与实验设计

诺氟沙星, CAS 号为 70458-96-7, 纯度 $\geq 98\%$, 购自北京索莱宝科技有限公司, 使用去离子水将 NOR 溶解配制成储备液 ($600 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 储存在 4°C 冰箱中。本研究所用刺参为实验室自主繁育的刺参幼体, 平均体质量 (4.15 ± 0.09) g。实验在玻璃纤维养殖水槽 ($80 \text{ cm} \times 55 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$) 中进行, 实验水体为 240 L。每组设置 3 个重复, 随机选择 270 只 (每槽 30 只) 体质量相近、生长状态良好的幼参分别放入 NOR 浓度为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (DZ)、 $1.5 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (NN) 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (NLC) 的海水中, 胁迫处理 56 d。

1.2 样品收集及处理

在无菌实验台上用无菌海水冲洗刺参体表, 用无菌解剖剪由肛门沿腹部向前剖开, 无菌胶头滴管吸取体腔液, 用质量分数为 75% 的乙醇冲洗肠道表面。取肠道样品装入 1.5 mL EP 冻存管迅速置于液氮冷冻, 置于 -80°C 冰箱中保存待测。

1.3 增重率和特定增长率测定

实验前称量各组海胆质量, 取其平均值作为初始体质量 (W_i)。暴露 56 d 后, 称量养殖水槽中每组海胆质量。取其平均值作为最终体质量 (W_e)。根据这些数据, 按照以下公式计算出增重率 (WGR) 和特定增长率 (SGR):

$$\text{WGR}(\%) = (W_e - W_i) / W_i \times 100$$

$$\text{SGR} = 100 \times (\ln W_e - \ln W_i) / t$$

式中: t 表示养殖时间 (d)。

1.4 酶活性测定

NOR 暴露 56 d 后, 从每组中随机取 5 头幼参肠道测定酶的活性。装入 EP 冻存管迅速置于液氮冷冻, -80°C 冰箱冻存。使用组织细胞破碎仪 (Buller Blender, Tissulyser-24, 美国 Next Advance 公司) 将肠组织样品和 0.28% 冷生理盐水均质, 4°C 离心 10 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。取上清液按照试剂盒说明书测定肠道超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、溶菌酶 (lysozyme, LZM)、脂肪酶 (lipase, LIP) 和淀粉酶 (amylase, AMY) 酶活性。蛋白质含量采用 Bradford 法^[27]测定, 以牛血清白蛋白为标准定量。实验所使用酶标仪为

Synergy H4 (Biotek, VT, USA), 使用南京建成生物工程研究所 (中国) 的商品试剂盒进行分析。

1.5 提取 DNA

选用 OMEG 试剂盒 (E.Z.N.A bacterial Mag-Bind Soil DNA Kit OMEGA) 提取刺参肠道菌群样品总 DNA, NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (型号 NanoDropOne, Thermo, USA) 测定样品中提取出的 DNA 含量及纯度, 质量分数 1% 的琼脂糖 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 中国) 凝胶将其进行电泳操作以检测 DNA 完整性。选择 DNA 含量、浓度高、完整性较好的条带进行测序。

1.6 PCR 扩增与高通量测序

以细菌 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 片段的扩增引物为 341F ($5' \text{-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'}$) 和 805R ($5' \text{-GACTACHVGGGTATCTAAT-3'}$) 作为扩增引物进行 PCR 扩增, 使用带 Barcode 的特异引物, New England Biolabs 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, 和高效高保真酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。

使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序。

1.7 数据分析

用 FASTP (版本 v0.23.2) 对 Illumina 平台的原始数据进行过滤, 标准如下: 去除含有未知核苷酸 (N) $\geq 10\%$ 的 reads; 去除 phred 质量评分 ≤ 20 的碱基 $\geq 50\%$ 的 reads; 删除含接头的 reads。对低质量 tag 过滤得到 clean tag。参照 QIIME 的 tags 质量控制流程。使用 UCHIME 算法进行 tag 的嵌合体检查。过滤嵌合体后得到的 effective tag 进行 OTU 丰度统计和其他后续分析。选取丰度最高的 tag 序列作为每个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 的代表序列。

采用 Usearch 软件, 以 97% 阈值开展 OTU 操作分类单元聚类。采用 RDPclassifier 软件进行物种分类操作, 并将阈值设置成 0.8, 将低于该阈值的分类汇总结果划入为 Unclassified 一类。采用 Mothur 软件对肠道菌群样品序列进行多样性分析。采用 Student's T 检验对肠道微生物数据进行差异性分析, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 NOR 处理对刺参生长性能的影响

暴露 56 d 后, 与对照组相比, NN 组和 NLC 组

刺参生长指标均出现显著性差异(表 1)。NN 组刺参体质量显著下降了 11.13% ($P<0.05$), 增重率显著下降了 51.26% ($P<0.05$), 特定增长率显著下降了 40.54% ($P<0.05$)。NLC 组刺参体质量显著下降了 17.39% ($P<0.05$), 增重率显著下降了 62.69% ($P<0.05$), 特定增长率显著下降了 58.11% ($P<0.05$)。此外, 与 NN 组相比, NLC 组体质量显著下降了 7.05% ($P<0.05$), 增重率显著下降了 23.36% ($P<0.05$), 特定增长率显著下降了 29.55% ($P<0.05$)。

2.2 NOR 处理对刺参肠道酶活性的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, NN 组和 NLC 组的抗氧化酶活性均出现显著性差异。其中 NN 组 SOD 活性和 CAT 活性分别显著提高了 24.20% ($P<$

0.05)和 13.85% ($P<0.05$), 而溶菌酶(LZM)活性显著下降了 16.69% ($P<0.05$); NLC 组的 SOD 活性和 CAT 活性分别显著提高了 60.22% ($P<0.05$)和 47.69% ($P<0.05$), LZM 活性显著下降了 36.28% ($P<0.05$)。与对照组相比, NN 组的消化酶活性均未出现显著性差异, 而 NLC 组的消化酶活性出现显著降低, 其中胃蛋白酶(PPS)活性、脂肪酶(LIP)活性和淀粉酶(AMY)活性分别显著下降了 65.82% ($P<0.05$)、24.26% ($P<0.05$)和 22.35% ($P<0.05$)。

2.3 高通量测序结果分析

不同浓度 NOR 胁迫下刺参肠道平均每样品测得 62 132 条 tags, 通过质量控制平均每组样品得到 58 191 条有效数据, 其中有效数据量为 55 195 bp,

表 1 诺氟沙星处理对刺参生长性能的影响

Table 1 Effects of norfloxacin exposure on growth performance of *Apostichopus japonicus*

指标 Index	对照组 Control group	低浓度处理组 Low-concentration group	高浓度处理组 High-concentration group
初始体质量(W_i)/g Initial weight (W_i)/g	4.08±0.08 ^a	4.26±0.13 ^a	4.12±0.09 ^a
最终体质量(W_c)/g End weight (W_c)/g	5.75±0.18 ^a	5.11±0.03 ^b	4.75±0.56 ^c
增重率(WGR)/% Weight gain rate (WGR)/%	40.93±2.07 ^a	19.95±1.07 ^b	15.29±3.55 ^c
特定增长率(SGR)/d ⁻¹ Specific growth rates (SGR)/d ⁻¹	0.74±0.03 ^a	0.44±0.02 ^b	0.31±0.03 ^c

注:同行数据后不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

表 2 诺氟沙星处理对刺参肠道酶活性的影响

Table 2 Effect of norfloxacin treatment on gut enzyme activities of *Apostichopus japonicus*

指标 Index	对照组 Control group	低浓度处理组 Low-concentration group	高浓度处理组 High-concentration group
超氧化物歧化酶(SOD)/(U·mL ⁻¹) Superoxide dismutase (SOD)/(U·mL ⁻¹)	51.28±0.77 ^c	63.69±1.32 ^b	82.76±0.25 ^a
过氧化氢酶(CAT)/(U·mL ⁻¹) Catalase (CAT)/(U·mL ⁻¹)	0.65±0.03 ^c	0.74±0.02 ^b	0.96±0.04 ^a
溶菌酶(LZM)/(U·mL ⁻¹) Lysozyme (LZM)/(U·mL ⁻¹)	35.36±0.74 ^a	29.46±0.22 ^b	22.53±0.68 ^c
胃蛋白酶(PPS)/(U·mg ⁻¹) Pepsin (PPS)/(U·mg ⁻¹)	3.25±0.12 ^a	3.42±0.17 ^a	1.96±0.23 ^b
脂肪酶(LIP)/(U·mg ⁻¹) Lipase (LIP)/(U·mg ⁻¹)	14.75±0.61 ^a	15.58±0.65 ^a	11.87±0.82 ^b
淀粉酶(AMY)/(U·mg ⁻¹) Amylase (AMY)/(U·mg ⁻¹)	1.04±0.02 ^a	1.07±0.03 ^a	0.85±0.04 ^b

注:同行数据后不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

质量控制有效率达 93.66%(表 3)。

2.4 α 多样性分析

Chao 1 和 ACE 指数常用来评价样品中菌群丰度,本研究中,上述指数均未出现显著性差异,说明 NOR 处理对刺参肠道菌群丰度未产生显著性影响 ($P>0.05$)。Shannon 和 Simpson 指数常用来评价样

品中菌群多样性。本研究中 NLC 组 Shannon 和 Simpson 指数显著低于 DZ 组和 NN 组,表明 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NOR 处理使肠道菌群多样性显著性降低 ($P<0.05$)(图 1)。

2.5 β 多样性分析

在 OTU 水平上,基于加权 Unifrac 距离对不同

表 3 诺氟沙星处理下刺参肠道菌群高通量测序结果

Table 3 High-throughput sequencing results of gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with norfloxacin

指标 Index	对照组 Control group	低浓度处理组 Low-concentration group	高浓度处理组 High-concentration group
OTU 数目 OTU number	972±44	1 480±616	857±244
原始序列 Original sequence	68 614±5 965	77 030±16 720	80 705±13 681
质量控制后序列 Quality control sequence	64 900±5 669	57 967±8 457	47 936±6 558
有效序列 Effective sequence	61 972±6 265	54 427±8 280	44 792±5 448

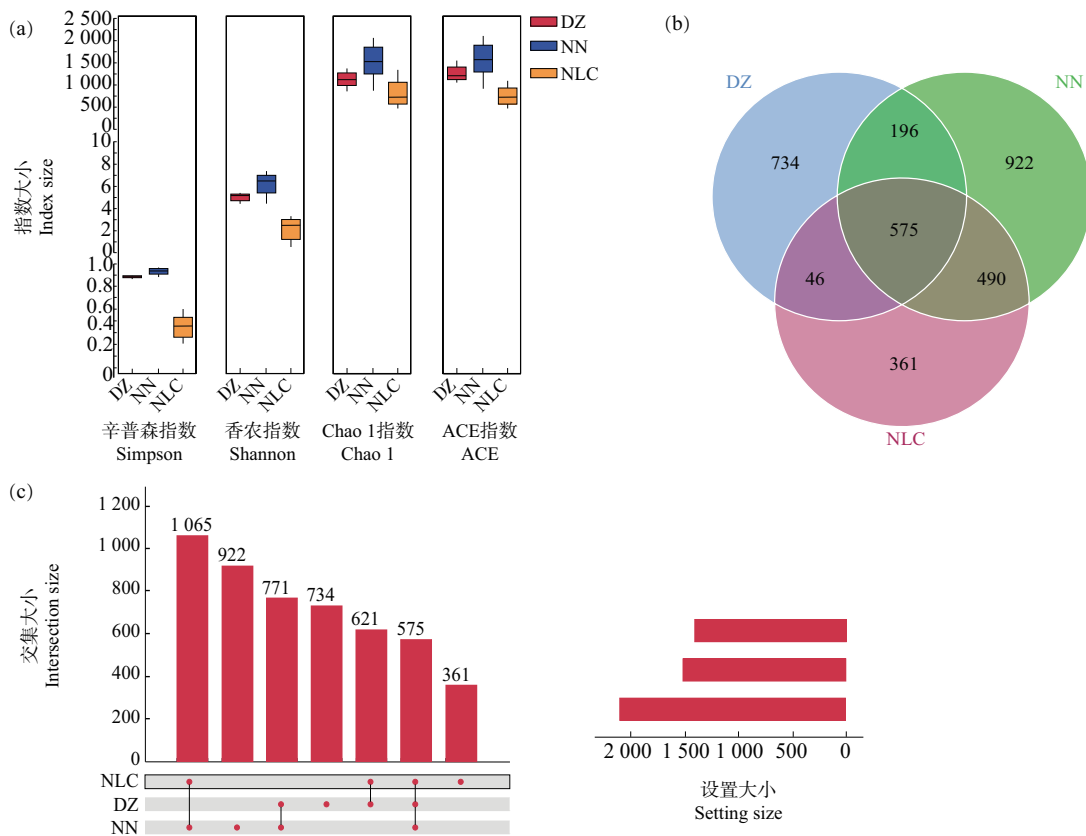


图 1 诺氟沙星 (NOR) 处理下刺参肠道菌群 α 多样性分析

注:(a) NOR 处理下刺参肠道菌群 α 多样性指数图;(b) NOR 处理下刺参肠道菌群 Venn 图;

(c) NOR 处理下刺参肠道菌群 Venn 柱形图;DZ、NN、NLC 分别代表 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照组、 $1.5\times 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组、 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组。

Fig. 1 α diversity in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with norfloxacin (NOR)

Note: (a) α diversity index in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR; (b) Venn petal diagram in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR; (c) Venn histogram in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR; DZ, NN and NLC respectively represent the control group with $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the experimental group with $1.5\times 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the experimental group with $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

浓度处理下肠道菌群样本进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。其中,第1主坐标(PC1)的贡献率为78.89%,第2主坐标(PC2)的贡献率为13.52%,二者累计贡献率为92.41%(图2)。同一浓度处理样品均聚集在一起,显示出较好的生物学重复性。不同组别间比较,150 mg·L⁻¹ NOR暴露组与其他组别肠道菌群结构具有显著差异。

2.6 优势菌群结构特征

门水平上,刺参暴露于1.5×10⁻¹ mg·L⁻¹和150 mg·L⁻¹ NOR中,其肠道第一优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria),相对丰度占比为43.91%~86.27%。次优势菌门分别为疣微菌门(Verrucomicrobia)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度占比分别为21.14%~21.69%、3.93%~16.14%和4.85%~6.97%(图3)。

属水平上,不同处理组刺参肠道菌群存在显著性差异。其中,DZ组相对丰度占比前3位的优势菌属分别为盐杆条菌属(*Haloferula*)(47.14%)、雷辛格氏菌属(*Sedimentitalea*)(7.57%)和硫杆菌属(*Lutibacter*)(4.28%);NN组相对丰度占比前3位的菌属为*Persicirhabdus*(26.40%)、硫杆菌属(19.31%)和脱硫菌属(*Desulfotalea*)(14.43%);NLC组相对丰度占比前3位的菌属为罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)

(79.82%)、硫杆菌属(1.80%)和弧菌属(*Vibrio*)(1.70%)。与DZ组相比,NN组中盐杆条菌属、弧菌属、乳酸菌属(*Lactobacillus*)等相对丰度显著下降;但硫杆菌属、脱硫菌属、*Persicirhabdus*等菌属相对丰度显著升高。NLC组中罗尔斯通氏菌相对丰度显著升高,优势菌属趋向单一化(图3)。对肠道菌群中相对丰度占比前30位的菌属进行分析,DZ组样品共筛选出13株抗生素敏感菌属分别是盐杆条菌属、乳酸菌属、弧菌属、南海雷辛格氏菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、海沈氏菌属(*Shimia*)、福尔摩沙属(*Formosa*)、亚硫酸杆菌(*Sulfitobacter*)、北极洛克氏菌(*Halocynthiibacter*)、罗姆布茨菌(*Romboutsia*)、浅黄苍黄杆菌(*Luteolibacter*)、*Jindonia*、甲基杆菌属(*Methyl-obacterium*);7株抗生素耐药菌属分别是罗尔斯通氏菌、*Persicirhabdus*、硫杆菌属、脱硫菌属、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、红杆菌属、食弧菌嗜盐噬菌蛭弧菌(*Halobacteriovorax*);NN组样品共筛选出4株抗生素敏感菌属分别是盐杆条菌属、乳酸菌属、弧菌属、雷辛格氏菌属,10株抗生素耐药菌属分别是*Persicirhabdus*、硫杆菌属、脱硫菌属、弓形杆菌属、红杆菌属、食弧菌嗜盐噬菌蛭弧菌、链球菌属(*Streptococcus*)、科尔维尔氏菌(*Colwellia*)、*Pseudoruegeria*、沙雷氏菌属(*Serratia*);NLC组样品共筛选出2株抗生素

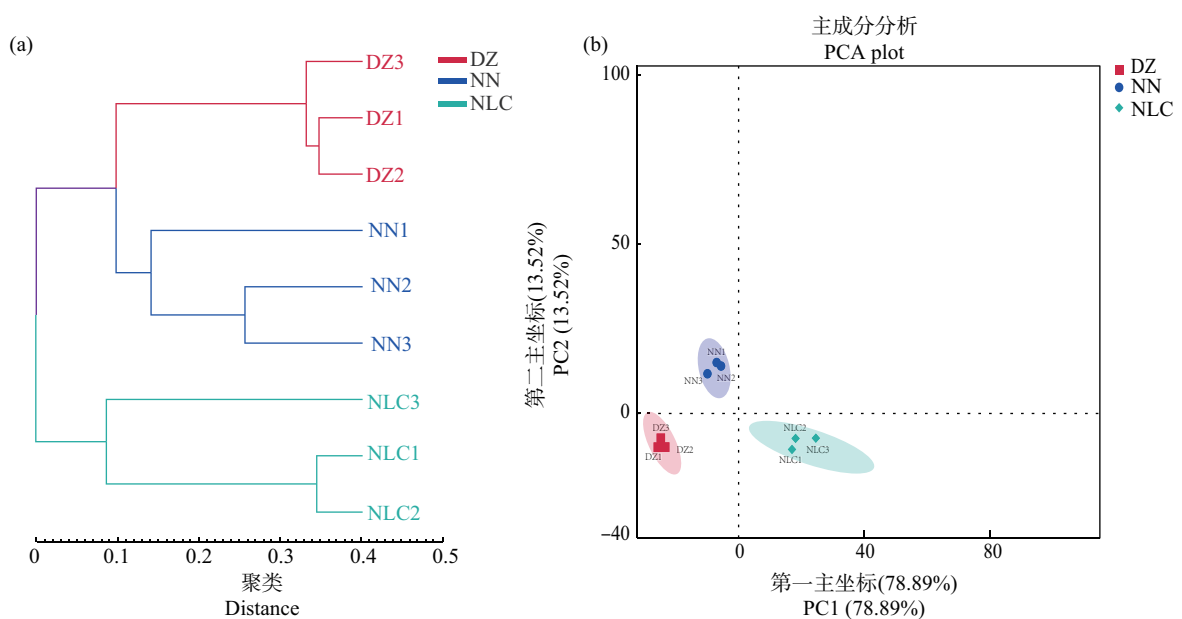


图2 NOR处理下刺参肠道菌群 β 多样性分析

注:(a) NOR处理下刺参肠道菌群UPGMA聚类树分析图;(b) NOR处理下刺参肠道菌群Unifrac PCA图。

Fig. 2 Analysis of β -diversity in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR

Note:(a) The UPGMA in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR; (b) The Unifrac PCA diagram in gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR.

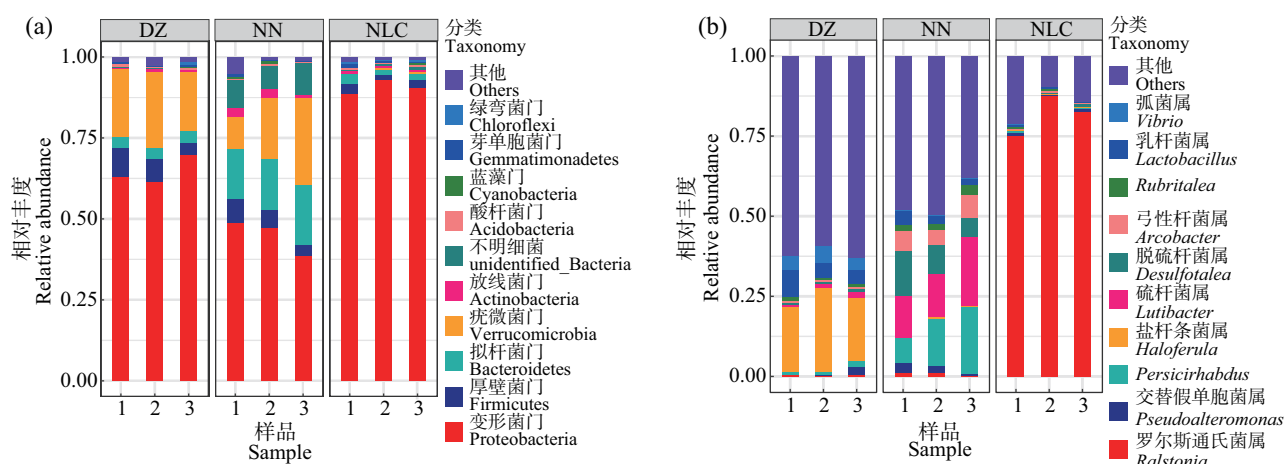


图 3 NOR 处理下刺参肠道菌群结构相对丰度图

注:(a)门水平上;(b)属水平上。

Fig. 3 Structure abundance map of gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* treated with NOR

Note: (a) At the phylum level; (b) At the genus level.

敏感菌属分别是乳酸菌属、弧菌属,1 株抗生素耐药菌属为罗尔斯通氏菌属。

2.7 差异菌群结构特征

基于 DZ 组对 NN、NLC 这 2 组分别进行 LEfSe 差异性分析结果显示(图 4、图 5),NN 组刺参肠道差异性菌门主要为拟杆菌门,其差异菌属分别隶属于黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、脱硫杆菌科(Desulfobulbaceae)。NLC 组刺参肠道差异性菌门主要为变形菌门,其差异性菌属隶属于 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)。

2.8 菌群功能特征

基于 KEGG 数据库注释,共得到 54 条具有显著($P < 0.05$)差异的三级代谢通路,可将其归为 26 条二级代谢通路和 6 条一级代谢通路。差异代谢通路主要表现在膜运输、氨基酸的复制及修复、多糖类碳水化合物的合成及代谢方面。与 DZ 组相比,NN 组和 NLC 组肠道菌群膜运输、氨基酸代谢通路丰度均出现显著性降低($P < 0.05$),mRNA 翻译、蛋白质复制及修复通路均出现显著性升高($P < 0.05$)。此外,NN 组多糖的生物合成和代谢通路丰度显著升高(图 6)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 NOR 暴露对刺参生长及酶活性的影响

刺参 NOR 暴露组($1.5 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 SGR 显著性下降,表明 NOR 对刺参的生长有一定的抑制作用。已有研究表明,NOR 暴露会影响水生动物的生长。例如,短期暴露(14 d)于 10、

100 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 NOR,可导致大黄鱼幼鱼生长和存活率下降^[17]。长期暴露(15 d)于 $5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NOR 中,可造成贻贝(*Mytilus coruscus*)特定增长率显著性下降^[28]。本研究中,随着 NOR 暴露浓度的升高,刺参 SGR 呈下降趋势,结合上述发现,进一步说明了 NOR 对水生动物的毒性作用。

刺参消化吸收能力主要取决于消化酶的活性,故消化酶活性在一定程度上可以反映宿主摄食水平和生长性能^[29]。消化酶活性受多种因素影响,如盐度、温度、肠道菌群、食物组成和摄食率等^[30-31]。本研究中, $1.5 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露下,刺参肠道消化酶活性未出现显著性变化,但 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露显著降低了肠道中消化酶活性,表明高浓度 NOR 暴露不利于刺参维持正常的消化吸收功能。已有研究表明,四环素和红霉素暴露可导致刺参营养物质消化率降低^[24],四环素和磺胺甲恶唑暴露降低了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)蛋白质和脂质消化率。这些结果表明,抗生素对生物消化吸收能力的影响可能与抗生素的种类和应用剂量有关^[32]。

免疫酶活性是评价无脊椎动物免疫能力的重要指标^[33],当生物体内发生氧化应激或炎症反应时,机体中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性出现显著升高^[34-35]。本研究中,不同浓度 NOR 暴露下,刺参肠道抗氧化酶活性显著升高,这说明 NOR 可提高刺参的抗氧化能力。已有研究证明,NOR 可导致活性氧(ROS)的过量产生,从而改变抗氧化参数,最终导致氧化应激和 DNA 损伤^[18]。在之前的毒性实验中,

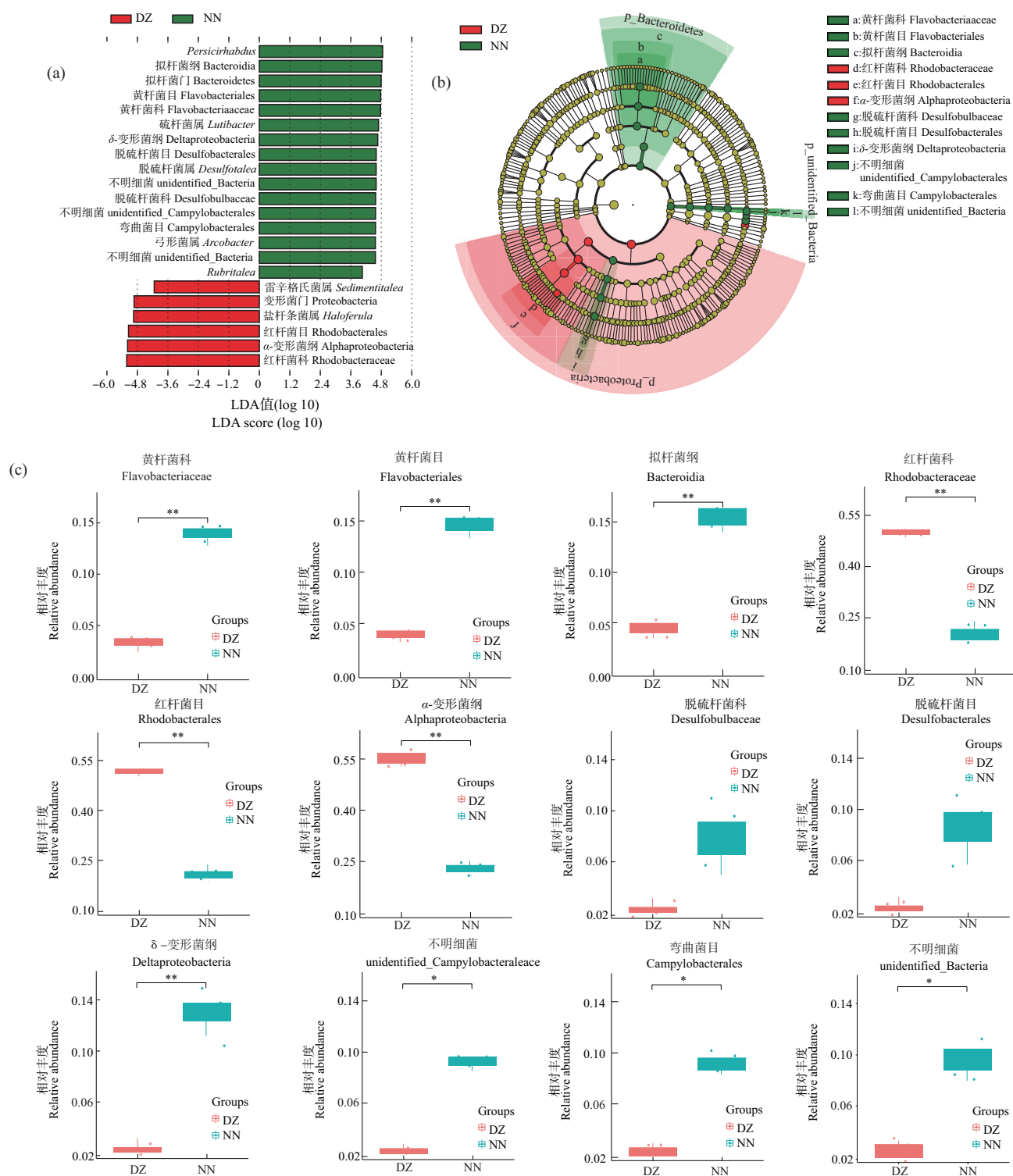


图 4 DZ 组和 NN 组刺参肠道菌群结构 LefSe 分析

注: (a) DZ 组和 NN 组肠道菌群 LDA 分布条形图; (b) DZ 组和 NN 组肠道菌群 LefSe 分析环形树状图; (c) DZ 组和 NN 组肠道差异菌群相对丰度图, 图中分别表示差异 OTU 在不同实验组的丰度差异, ** 表示差异显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$), 无标注则为不显著 ($P > 0.05$)。

Fig. 4 LefSe analysis of gut bacterial community in groups DZ and NN of *Apostiopsis japonicus*

Note: (a) Bars of gut bacterial community LDA distribution in groups DZ and NN; (b) Ring-tree diagram of LefSe analysis of gut bacterial community in groups DZ and NN; (c) The relative abundance of gut different bacterial community in DZ and NN; the figure shows the abundance difference of OTU in different experimental groups, where ** indicates significant difference ($P < 0.01$), * indicates significant difference ($P < 0.05$) and is not significant without annotation ($P > 0.05$).

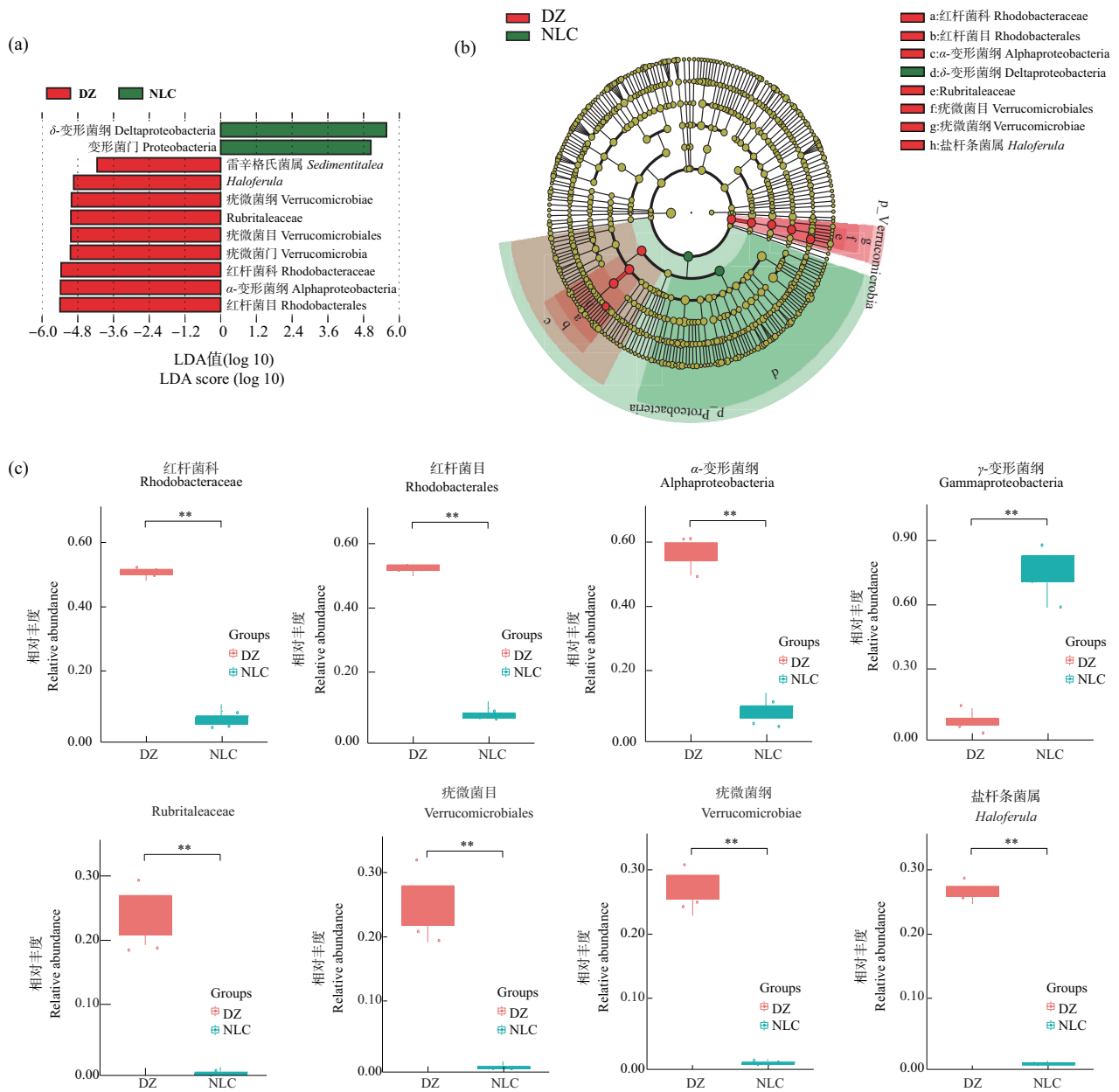


图 5 DZ 组和 NLC 组刺参肠道菌群结构 LEfSe 分析

注:(a) DZ 组和 NLC 组肠道菌群 LDA 分布条形图;(b) DZ 组和 NLC 组肠道菌群 LEfSe 分析环形树状图;
(c) DZ 组和 NLC 组肠道差异菌群相对丰度图,其中**表示差异显著($P<0.01$),*表示差异显著($P<0.05$),无标注则为不显著($P>0.05$)。

Fig. 5 LEfSe analysis of gut bacterial community in groups DZ and NLC of *Apostiopsis japonicus*

Note: (a) Bars of gut bacterial community LDA distribution in groups DZ and NLC; (b) Ring-tree diagram of LEfSe analysis of gut bacterial community in groups DZ and NLC; (c) The relative abundance of gut different bacterial community in DZ and NLC, where ** indicates significant difference ($P<0.01$), * indicates significant difference ($P<0.05$) and is not significant without annotation ($P>0.05$).

NOR 在诱导大黄鱼肠道炎症的同时增强了超氧化物歧化酶活性^[17]。本研究结果表明,NOR 暴露组刺参的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性显著升高,这表明 NOR 影响了刺参的非特异性免疫,引起刺参发生氧化应激和炎症反应。

溶菌酶在无脊椎动物对外来抗原入侵的反应中起着至关重要的防御作用,溶菌酶也有助于细菌诱导的免疫反应^[6]。研究表明,暴露于 NOR 的斑马鱼幼鱼溶菌酶活性显著降低^[37]。此外,暴露于 NOR 的泥蚶血细胞中溶菌酶的浓度和活性显著降低^[18]。

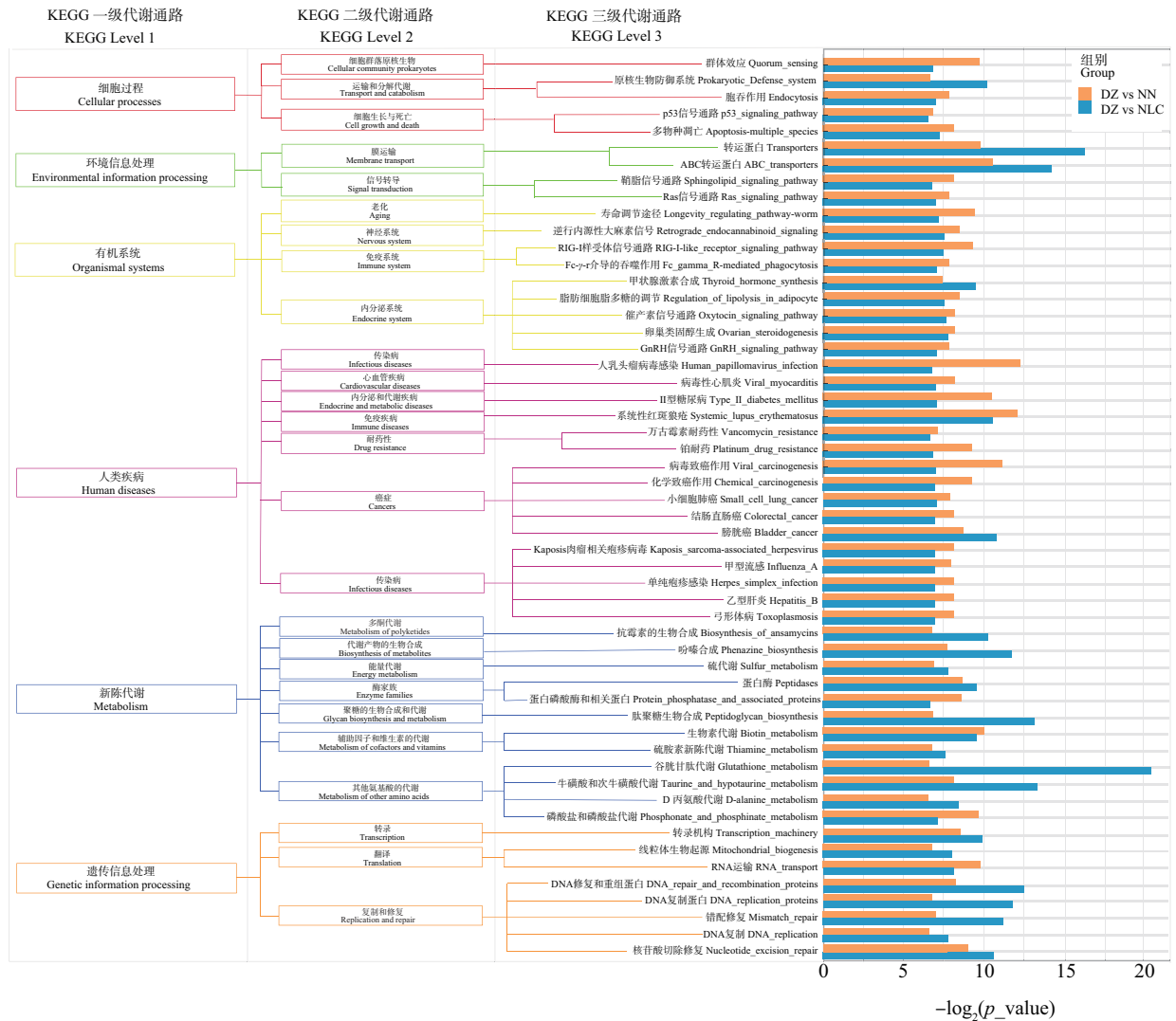


图 6 基于 KEGG 数据库刺参肠道菌群差异代谢通路丰度图

Fig. 6 Abundance map of gut bacterial community of *Apostichopus japonicus* differential metabolic pathway based on KEGG database

本研究发现, NOR 暴露显著降低了刺参溶菌酶活性,削弱了其对外来抗原的反应能力^[36]。外来微生物入侵最终诱发免疫应答。

3.2 NOR 暴露下刺参肠道菌群多样性特征

肠道菌群的组成结构与宿主的能量平衡、物质循环和生理免疫密切相关。已有研究发现,生理状态、食物条件、环境等外界因素均可影响肠道菌群的组成^[38-40]。本研究中 NOR 暴露对于肠道菌群多样性的影响存在差异性,其中 $1.5 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露未对刺参肠道菌群多样性造成显著性影响,而 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露显著降低了肠道菌群多样性。Uyaguari 等^[41]研究发现,将草虾(*Penaeus monodon*)暴露于低浓度氧四环素($1, 16, 32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中,其肠

道菌群多样性未出现显著性变化,而暴露于高浓度($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中,肠道细菌多样性显著降低。洪嘉炜^[42]研究发现, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的恩诺沙星暴露对华贵栉孔扇贝(*Mimachlamys crassicostata*)的肠道菌群多样性无显著性影响, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高浓度暴露可显著降低其肠道菌群多样性。以上研究表明,肠道菌群对外界干扰具有一定的动态调节能力,一定程度上可以维持肠道微环境的平衡状态。然而,随着胁迫浓度的增加,肠道微环境受到破坏,导致菌群的单一化,最终引起菌群紊乱^[43]。

3.3 NOR 暴露下刺参肠道菌群结构特征

本研究中刺参暴露于 NOR 下其肠道第一优势菌门均为变形菌门,这与 Wang 等^[44]和 Zhang 等^[45]

的研究结果相同。变形菌门作为肠道菌群中的第一优势菌门,主要是由于其在原核生物分子生物学中规模最大、表型最多样化^[46]。其中, α -变形菌依靠自身光合作用产生的能量,在有机化合物的矿化过程和营养成分的循环过程中发挥着重要的作用^[47]。 γ -变形菌可产生多种降解性酶包括羧甲基纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酶(果胶酸内裂解酶、果胶甲酯酶)和木聚糖酶,以降解食物中的大分子多糖^[48]。

然而,刺参肠道菌群相对丰度随 NOR 浓度的升高而出现显著性差异,其中 NN 组肠道差异菌以拟杆菌门为代表。已有研究表明,拟杆菌门含有大量由可逆启动子调控的抗生素抗性基因,这些抗性基因导致对多种抗生素产生耐药性,如氟喹诺酮类、大环内酯类、林可霉素类、链霉素和四环素类^[49-51]。Zhao 等^[44]研究了氧四环素(oxytetracycline, OTC)、红霉素(erythromycin, EM)和 NOR 共 3 种典型抗生素对幼参肠道细菌的影响,结果发现,3 种抗生素对幼参肠道细菌的重塑具有不同的模式,其中变形菌门的丰度随着抗生素的暴露而显著降低,而拟杆菌门的丰度在抗生素组中显著升高,与本研究结果相似。但 Li 等^[52]利用宏基因组测序技术,评估了 0 、 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 对鲤鱼幼鱼肠道微生物群的慢性毒性,结果发现,NOR 暴露对拟杆菌门相对丰度无显著影响。分析产生此差异的原因,可能是由于不同生物对 NOR 敏感性差异所导致的。本研究中 NN 组差异菌属隶属于黄杆菌科,已有研究发现,黄杆菌科具有低致病性,并能产生具有抗氧化活性的类胡萝卜素^[53-54]。更重要的是,肠道中的黄杆菌科可产生降解微藻或大型藻中琼脂、岩藻聚糖、焦糖、层黏胶蛋白、木聚糖的酶^[55]。黄杆菌科对多种抗生素具有高水平的耐药性^[56]。一些黄杆菌种类可以在刺参肠道中矿化各种类型的有机物(碳水化合物、氨基酸、蛋白质和多糖),并能够降解各种纤维素衍生物,如羧甲基纤维素^[57]。黄杆菌科的酶促能力可以直接或间接地矿化肠道中各种类型的有机物,增加碳水化合物的产生,这对海参在应对外界胁迫过程中是有利的,从而促进肠道微生态的动态平衡。

值得注意的是, $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露导致刺参肠道菌群结构出现单一化的现象。其中变形菌门下罗尔斯通氏菌占比高达 79.82%。研究发现,NOR 可能会引起生物体内的氧化应激反应,导致过量的活性氧自由基产生,而罗尔斯通氏菌是一些鱼类肠

道内的核心微生物,具有多种酶系统,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和催化酶等,这些酶能够降解和清除细胞内的活性氧自由基,从而减少氧化应激的损伤^[58-60]。由此推测,罗尔斯通氏菌菌株可能具有一定的抗氧化能力,能够更有效应对氧化应激,从而在高浓度 NOR 暴露下相对较好地存活和繁殖。罗尔斯通氏菌自身毒性较低,但可导致许多潜在的有害感染和死亡,是利用潜在条件和疾病的机会致病菌,可导致人体产生菌血症、败血症等炎症,并使虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和鲤(*Cyprinus carpio*)等水生生物产生溃疡等疾病^[61-62]。 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露下,罗尔斯通氏菌在刺参肠道中占据绝对优势。肠道菌群单一化会破坏机体肠道动态平衡,进而影响肠道维持正常的生理功能,使机体更易受环境因子变化影响而患病甚至死亡^[27]。因此在养殖过程中控制水体抗生素浓度是十分必要的,一则,注意定期监测水体抗生素浓度,避免因残留抗生素浓度过高造成刺参肠道微生态的失衡;二则,在养殖过程中定时清底、定期换水,适当添加微生态制剂等途径以改善养殖环境,从而降低机体因外界因子变化而感染疾病的风险。

3.4 NOR 暴露下刺参肠道菌群功能特征

肠道菌群参与多种物质循环与中间产物的运输、消化吸收和分解代谢、有机物的代谢及转化、转录翻译、蛋白质的合成及修饰等功能密切相关^[63-64]。基于 KEGG 差异代谢通路数据库注释,NOR 暴露下肠道菌群功能特征存在显著性差异,主要表现在膜运输、氨基酸的复制及修复、多糖类碳水化合物的合成及代谢等方面。

相比于 DZ 组,NN 组多糖合成与代谢速率出现显著升高($P < 0.05$)。拟杆菌门作为肠道菌群微生态中丰度最高的革兰氏阴性菌门,其可通过自身发酵作用水解大分子多糖及长链脂肪酸,在代谢溶解性有机物质及调节肠道环境方面发挥重要作用^[65-67]。拟杆菌门下黄杆菌科依靠其独特的多糖代谢位点结构,高效降解植物多糖,此结构内的基因可对糖类水解酶进行编码,进而帮助生物体水解大分子糖类如糖苷、多糖等,从而提高机体的糖类利用效率^[68]。黄杆菌科下硫杆菌属可以通过高效利用宿主肠道环境中的氮元素,在一定程度上降低宿主肠道中硝酸盐、亚硝酸盐的含量,避免其在肠道中过度堆积而对生物体有害^[69]。本研究中 NN 组肠道差异菌门为拟杆菌门,当刺参暴露在 $1.5 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 环境中

时,其肠道中拟杆菌门相对丰度出现显著性升高。由此推断,低浓度胁迫下,机体通过提高有机物质的循环速率以降低外界压力,NLC 组膜运输及氨基酸合成速率显著降低($P<0.05$),已有研究发现,NOR 可通过降低细胞膜的通透性,抑制细胞与外界进行物质交换,从而减缓细胞膜的运输效率^[2]。刺参肠道中含有大量参与氨基酸代谢的细菌群落,其可通过自身生理活动分泌多种蛋白质水解酶,加快氨基酸的合成与代谢过程^[70]。如拟杆菌门可通过自身活动直接合成氨基酸,或通过分泌消化酶等方式促进机体氨基酸的生物合成^[71]。本研究中 NLC 组肠道特异性菌门为变形菌门,其下罗尔斯通氏菌作为机会致病菌占领肠道生态位并大量繁殖使肠道菌群趋于单一化,肠道微生态平衡被打破,肠道菌群多样性显著降低。由此可以推断本研究中 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NOR 暴露下,肠道微生态严重失衡,参与氨基酸合成过程菌群的大量死亡导致机体氨基酸合成速率的降低^[15,28]。

本研究中随着 NOR 胁迫浓度的升高,刺参生长率显著降低,消化酶和免疫酶活性升高,机体氧化应激反应加剧,刺参肠道菌群逐渐被罗尔斯通氏菌所取代,呈现出肠道菌群单一化;同时肠道菌群膜运输和代谢途径受到显著性影响。本研究仅局限于考虑 NOR 单一胁迫,后续将进一步结合具体海域情况开展养殖水体中多种抗生素协同胁迫下刺参肠道菌群动态变化研究,以期对刺参养殖环境风险评估提供一定的理论参考。

通信作者简介:王萃(1985—),女,博士,副研究员,主要研究方向为水产养殖微生态。

参考文献 (References):

- [1] Verner-Jeffreys D W, Shields R J, Bricknell I R, et al. Effects of different water treatment methods and antibiotic addition on larval survival and gut microflora development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk-sac larvae [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/4): 129-143
- [2] 夏昆华,周鲁,郝丽芬.喹诺酮类抗生药的研究进展[J].国外医药(抗生素分册),2004,25(3):138-141
Xia K H, Zhou L, Hao L F. Research progress of quinolone antibiotics [J]. *World Notes on Antibiotics*, 2004, 25(3): 138-141 (in Chinese)
- [3] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业部公告第2292号[EB/OL].(2015-09-01)[2023-09-15].http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/jiuqi/201712/t20171219_6103873.htm
- [4] 刘桂英,葛坤,王召会,等.近岸海域抗生素污染状况的研究进展[J].渤海大学学报(自然科学版),2017,38(4):331-336
Liu G Y, Ge K, Wang Z H, et al. Research progress on antibiotic pollution in coastal marine waters [J]. *Journal of Bohai University (Natural Science Edition)*, 2017, 38(4): 331-336 (in Chinese)
- [5] 杜鹃.黄渤海部分区域近岸海域中抗生素的分布、分配及释放动力学[D].大连:大连理工大学,2021:6-11
Du J. Occurrence, distribution and desorption kinetics of antibiotics in regional coastal area of the Yellow Sea and the Bohai Sea [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2021: 6-11 (in Chinese)
- [6] 赵富强,高会,张克玉,等.中国典型河流域抗生素的赋存状况及风险评估研究[J].环境污染与防治,2021,43(1):94-102
Zhao F Q, Gao H, Zhang K Y, et al. Occurrence and risk assessment of antibiotics in typical river basins in China [J]. *Environmental Pollution & Control*, 2021, 43(1): 94-102 (in Chinese)
- [7] Zou S C, Xu W H, Zhang R J, et al. Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities [J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2913-2920
- [8] 闫如玉.上海市养殖场抗生素及其他药物的赋存特征与风险评估[D].上海:华东师范大学,2019:50-56
Yan R Y. Occurrence characteristics and risk assessment of antibiotics and other drugs in Shanghai livestock farms [D]. Shanghai: East China Normal University, 2019: 50-56 (in Chinese)
- [9] Chen K, Zhou J L. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China [J]. *Chemosphere*, 2014, 95: 604-612
- [10] 陈孝焯,吴志新,操玉涛.诺氟沙星对中华鳖消化道菌群的影响[J].华中农业大学学报,2002,21(3):269-272
Chen X X, Wu Z X, Cao Y T. Effect of norfloxacin on the microflora in the digestive tract of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural*, 2002, 21(3): 269-272 (in Chinese)
- [11] Chen H, Liu S, Xu X R, et al. Antibiotics in the coastal environment of the Hailing Bay Region, South China Sea: Spatial distribution, source analysis and ecological risks [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 95(1): 365-373
- [12] 贺诗静.诺氟沙星对斑马鱼胚胎的神经毒性及机制研究[D].武汉:武汉大学,2017:21-34
He S J. Neurotoxicity of norfloxacin in zebrafish embryos (*Danio rerio*) [D]. Wuhan: Wuhan University, 2017: 21-34

- 34 (in Chinese)
- [13] Liao X B, Zou R S, Li B X, et al. Biodegradation of chlortetracycline by acclimated microbiota [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2017, 109: 11-17
- [14] Zhao Y, Wang Q, Liu H, et al. High-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons characterizes gut microbiota shift of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* feeding with three antibiotics [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(5): 1714-1725
- [15] Flint H J, Scott K P, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(10): 577-589
- [16] Tzuc J T, Escalante D R, Rojas Herrera R, et al. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: Digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. SpringerPlus, 2014, 3: 280
- [17] Wang X H, Hu M H, Gu H X, et al. Short-term exposure to norfloxacin induces oxidative stress, neurotoxicity and microbiota alteration in juvenile large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115397
- [18] Zhao X L, Li P, Zhang S Q, et al. Effects of environmental norfloxacin concentrations on the intestinal health and function of juvenile common carp and potential risk to humans [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 287: 117612
- [19] Franco I, Regina A, Gil L, et al. Molecular characterization and susceptibility to antimicrobial drugs of isolated bacteria from shrimps (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Cab International*, 2010, 49(7): 2496-2501
- [20] Xu R, Li L A, Zheng J H, et al. Combined toxic effects of nanoplastics and norfloxacin on mussel: Leveraging biochemical parameters and gut microbiota [J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 880: 163304
- [21] 常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增殖养殖现状、存在问题与展望[J]. *水产科学*, 2006, 25(4): 198-201
- Chang Y Q, Sui X L, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture [J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 198-201 (in Chinese)
- [22] 刘美如. 辽宁省不同地区春季刺参肠道菌群分析与比较[D]. 大连: 大连海洋大学, 2018: 7-8
- Liu M R. Analysis and comparison on intestinal microbiota of sea cucumber *Apostichopus japonicus* from different habitats in spring in Liaoning Province [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018: 7-8 (in Chinese)
- [23] 王紫薇. 进食阶段仿刺参肠道菌群多样性和可培养细菌活性的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021: 7-15
- Wang Z W. The diversity of intestinal microflora and the bioactivities of culturable bacteria associated with sea cucumber *Apostichopus japonicus* at the feeding stage [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021: 7-15 (in Chinese)
- [24] Díaz-Díaz L M, Rosario-Meléndez N, Rodríguez-Villafañe A, et al. Antibiotics modulate intestinal regeneration [J]. *Biology*, 2021, 10(3): 236
- [25] 林志萍. 磺胺甲恶唑胁迫下刺参肠道菌群及宿主代谢特征研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023: 21-30
- Lin Z P. Study on intestinal flora and host metabolic characteristics of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) under sulfamethoxazole stress [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023: 21-30 (in Chinese)
- [26] 李石磊, 杨慧花, 张乾, 等. 药浴对仿刺参幼参肠道菌群的影响[J]. *水产科学*, 2023, 42(5): 871-877
- Li S L, Yang H H, Zhang Q, et al. Effects of medicated bath on gut microbiota of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Fisheries Science*, 2023, 42(5): 871-877 (in Chinese)
- [27] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254
- [28] Xu R, Li L A, Zheng J H, et al. Combined toxic effects of nanoplastics and norfloxacin on mussel: Leveraging biochemical parameters and gut microbiota [J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 880: 163304
- [29] Tang L, Feng L, Sun C Y, et al. Effect of tryptophan on growth, intestinal enzyme activities and *TOR* gene expression in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Studies *in vivo* and *in vitro* [J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 23-33
- [30] Bao N, Ren T J, Han Y Z, et al. Alteration of growth, intestinal *Lactobacillus*, selected immune and digestive enzyme activities in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*, fed dietary multiple probiotics [J]. *Aquaculture International*, 2017, 25(5): 1721-1731
- [31] Gao F, Yang H S, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 714-722
- [32] Limbu S M, Zhou L, Sun S X, et al. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk [J]. *Environment International*, 2018, 115: 205-219
- [33] Yan F J, Tian X L, Dong S L, et al. Growth performance,

- immune response, and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed a supplementary diet of the potential probiotic *Paracoccus marcusii* DB11 [J]. *Aquaculture*, 2014, 420-421: 105-111
- [34] Qiao R X, Sheng C, Lu Y F, et al. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 662: 246-253
- [35] Solomando A, Capó X, Alomar C, et al. Long-term exposure to microplastics induces oxidative stress and a pro-inflammatory response in the gut of *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266 (Pt 1): 115295
- [36] Bachali S, Jager M, Hassanin A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 54(5): 652-664
- [37] Liang X M, Wang F, Li K B, et al. Effects of norfloxacin nicotinate on the early life stage of zebrafish (*Danio rerio*): Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 262-269
- [38] Thaiss C A, Zmora N, Levy M, et al. The microbiome and innate immunity [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 65-74
- [39] Zhang M L, Shan C J, Tan F, et al. Gnotobiotic models: Powerful tools for deeply understanding intestinal microbiota-host interactions in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734800
- [40] Daniel L, Erik R, Myklebust R, et al. Dietary Effect of Soybean (*Glycine max*) Products on Gut Histology and Microbiota of Fish [M]// El-Shemy H. Soybean and Nutrition. InTech, 2011: 231-250
- [41] Uyaguari M, Key P, Moore J, et al. Acute effects of the antibiotic oxytetracycline on the bacterial community of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(12): 2715-2724
- [42] 洪嘉炜. 恩诺沙星对三种经济贝类肠道微生物群落的影响[D]. 海口: 海南大学, 2019: 26-35
Hong J W. Effects of enrofloxacin on intestinal microbial community in three economic shellfish [D]. Haikou: Hainan University, 2019: 26-35 (in Chinese)
- [43] 苗淑彦, 韩蓓, 胡俊涛, 等. 饲料中添加不同浓度四环素对乌鳢生长性能、肠道菌群组成和组织形态的影响 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(12): 5813-5822
Miao S Y, Han B, Hu J T, et al. Effects of dietary different concentrations of tetracycline on growth performance, intestinal microbiota composition and morphology of *Chan-*
na argus [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(12): 5813-5822 (in Chinese)
- [44] Wang L, Zhao X W, Xu H C, et al. Characterization of the bacterial community in different parts of the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its variation during gut regeneration [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(5): 1987-1996
- [45] Zhang Z, Xing R L, Lv Z M, et al. Analysis of gut microbiota revealed *Lactococcus garviaeae* could be an indicative of skin ulceration syndrome in farmed sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 148-154
- [46] 王轶南, 朱世伟, 常亚青. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析 [J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 119-122
Wang Y N, Zhu S W, Chang Y Q. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 119-122 (in Chinese)
- [47] Cardona E, Gueguen Y, Magré K, et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 157
- [48] Morrison M, Pope P B, Denman S E, et al. Plant biomass degradation by gut microbiomes: More of the same or something new? [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(3): 358-363
- [49] Yan W, Hall A B, Jiang X F. Bacteroidales species in the human gut are a reservoir of antibiotic resistance genes regulated by invertible promoters [J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2022, 8(1): 1-9
- [50] Pumbwe L, Ueda O, Yoshimura F, et al. *Bacteroides fragilis* BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(1): 37-46
- [51] Bartha N A, S6ki J, Urbán E, et al. Investigation of the prevalence of tetQ, tetX and tetX1 genes in *Bacteroides* strains with elevated tigeicycline minimum inhibitory concentrations [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38(6): 522-525
- [52] Li P, Chen C Z, Zhao X L, et al. Metagenomics analysis reveals the effects of norfloxacin on the gut microbiota of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Chemosphere*, 2023, 325: 138389
- [53] Jooste P J, Hugo C J. The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family Flavobacteriaceae [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(2-3): 81-94

- [54] Shindo K, Kikuta K, Suzuki A, et al. Rare carotenoids, (3R)-saproxanthin and (3R, 2'S)-myxol, isolated from novel marine bacteria (Flavobacteriaceae) and their antioxidative activities [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(6): 1350-1357
- [55] Sakai T, Kimura H, Kato I. A marine strain of Flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan [J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(4): 399-405
- [56] Thomson K S. Antibiotic resistance of *Flavobacterium* and related genera [D]. Hobart: University of Tasmania, 1988: 16-24
- [57] Bernardet J F, Bowman J P. The Genus *Flavobacterium* [J]. *The Prokaryotes*, 2006, 7: 481-531
- [58] Wu Z B, Zhang Q Q, Lin Y Y, et al. Taxonomic and functional characteristics of the gill and gastrointestinal microbiota and its correlation with intestinal metabolites in NEW GIFT strain of farmed adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 617
- [59] Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V, et al. Norfloxacin: Toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 560235
- [60] Zivna D, Plhalova L, Praskova E, et al. Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid [J]. *Neuro Endocrinology Letters*, 2013, 34 (Suppl 2): 116-122
- [61] Behera B K, Paria P, Das A, et al. Molecular characterization and pathogenicity of a virulent *Acinetobacter baumannii* associated with mortality of farmed Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton 1822) [J]. *Aquaculture*, 2017, 471: 157-162
- [62] Ryan M P, Adley C C. *Ralstonia* spp.: Emerging global opportunistic pathogens [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2014, 33(3): 291-304
- [63] Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, et al. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 12-19
- [64] Xiong J B, Dai W F, Li C H. Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: The guidelines from an ecological perspective [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 6947-6954
- [65] 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
- [66] Schwalm N D 3rd, Groisman E A. Navigating the gut buffet: Control of polysaccharide utilization in *Bacteroides* spp. [J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(12): 1005-1015
- [67] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): D490-D495
- [68] Sonnenburg J L, Xu J, Leip D D, et al. Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1955-1959
- [69] 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 Q, Li G Y, Luo K, et al. Microbial diversity in broodstock waters of the two genders of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 130-138 (in Chinese)
- [70] Xia B, Gao Q F, Wang J Y, et al. Effects of dietary carbohydrate level on growth, biochemical composition and glucose metabolism of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) [J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 63-70
- [71] Li M M, Shang Q S, Li G S, et al. Degradation of marine algae-derived carbohydrates by bacteroidetes isolated from human gut microbiota [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(4): 92 ◆