

长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及其养殖水体的微生物菌群结构和潜在病原菌分析

田甜, 张建明, 朱欣, 张德志, 舒婷婷

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: 长江鲟 (*Acipenser dabryanus*) 为中国特有鱼类, 已被国际自然保护联盟 (IUCN) 列为极危级 (CR) 物种。通过 Illumina 高通量测序技术, 探究了长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及其养殖水体的微生物菌群组成、多样性及动态变化, 以期为长江鲟幼鱼健康养殖和病害分析提供参考依据。结果显示: 养殖水体微生物多样性最高, 黏液次之, 肠道内容物最低。黏液和肠道内容物微生物菌群结构更为相似, 且可与养殖水体微生物菌群区分开来。在门水平, 黏液和肠道内容物均以放线菌门、变形菌门和厚壁菌门为主; 养殖水体则以变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门为主。研究还发现 7 种可能的病原菌在养殖水体和黏液中富集, 当鱼体处于应激状态或养殖环境恶化时, 可能导致病害发生。BugBase 表型预测分析发现, 长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及其养殖水体中存在革兰氏阴性菌和阳性菌。其中肠道内容物的优势菌群为革兰氏阳性菌, 占比超过 60%; 黏液和养殖水体的优势菌群均为革兰氏阴性菌, 占比分别为 60% 和 70%。在氧气需求方面, 黏液和肠道内容物以好氧菌为主, 养殖水体以好氧菌和兼性厌氧菌为主。

关键词: 长江鲟; 黏液; 肠道内容物; 养殖水体; 高通量测序; 菌群结构; 潜在病原菌

中图分类号: S 943

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Analysis of microbiammunl coity structure and potential pathogens in mucus, intestinal content of *Acipenser dabryanus* and culture water

TIAN Tian, ZHANG Jianming, ZHU Xin, ZHANG Dezhi, SHU Tingting

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

Abstract: Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*) is an endemic fish in China and has been listed as a critically endangered (CR) species by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). In order to provide a reference basis for healthy breeding and disease analysis of juvenile Yangtze sturgeon, we analyzed the composition, diversity and dynamic changes of microbial flora between its surface mucus, intestinal content and culture water by using Illumina high-throughput sequencing technology. The results show the diversity of microorganisms in culture water was higher than that in mucus and intestinal content. The microbial community structure of mucus and intestinal content were more similar, and could be clearly distinguished from the microbial community of culture water. On phylum level, mucus and intestinal content were mainly composed of Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes, while the culture water was mainly composed of Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. Seven potential pathogenic genera were found, mainly in culture water and mucus which might lead to the occurrence of diseases under certain circumstances. BugBase phenotype prediction analysis reveals that both Gram negative and Gram positive bacteria were present in the mucus, intestinal content and culture water of juvenile Yangtze sturgeon. The dominant microbiota

收稿日期: 2023-04-28; 修回日期: 2023-06-01

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2022CFB738)

作者简介: 田甜 (1984—), 女, 高级工程师, 硕士, 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

of intestinal content was Gram positive bacteria, accounting for over 60%. The dominant microbial communities in mucus and culture water were both Gram negative bacteria, accounting for 60% and 70%, respectively. In terms of oxygen demand, mucus and intestinal content were mainly composed of aerobic bacteria, while culture water was mainly composed of aerobic and facultative anaerobic bacteria.

Keywords: *Acipenser dabryanus*; Mucus; Intestinal content; Culture water; High-throughput sequencing; Bacterial community structure; Potential pathogens

像哺乳动物一样, 鱼类的微生物主要集中在体表和消化道, 并形成了相应的菌群结构, 对宿主的健康发育和生长具有重要作用。鱼类体表是保护机体的一道重要屏障, 体表分泌的黏液构成了鱼体与水环境的隔离界面^[1], 成为防御入侵的第一道防线, 同时也是鱼体天然免疫的重要组成部分^[2]。肠道微生物菌群数量丰富、结构复杂, 被称为宿主的额外器官, 具有维持宿主营养吸收^[3]、免疫调控^[4]、生长发育^[5]等重要作用。鱼类的肠道微生物系统是后天形成的, 其菌群结构与宿主自身发育状态、养殖环境和饵料种类密切相关。鱼类生活在水中, 水中含有复杂多样的微生物, 其皮肤黏液和肠道更容易受到水环境的影响。Giatsis 等^[6]认为水环境对孵化后罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 肠道微生物的最初定殖起到了重要作用。因此, 鱼类和体表黏液、肠道、水环境中的微生物互相依赖、互相制约、动态平衡才能保证宿主的健康生长。

研究发现不同生境导致草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 前肠微生物组成差异较大: 自然生境的优势菌属是不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和贪铜菌属 (*Cupriavidus*); 高密度池塘养殖生境的优势菌属是鲸杆菌属 (*Cetobacterium*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*); 低密度池塘生境的优势菌属是链球菌属 (*Streptococcus*) 和消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)^[7]。樊英等^[8]采用 16S rRNA 高通量测序技术分析大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 表皮黏液和肠道内容物的微生物多样性, 结果显示表皮黏液和肠道内容物的微生物既有相似性又有差异性, 二者共有操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 数量为 33 个, 表皮黏液具有更高的微生物多样性, 而肠道内容物具有更高的微生物丰富度。郝佳慧等^[9]通过 Illumina MiSeq 扩增子高通量测序技术分析了小头裸裂尻鱼 (*Herzensteinia microcephalus*) 的皮肤黏液、肠道黏膜和肠道内容物间微生物菌群的组成差异, 发现皮肤黏液微生物多样性最高, 肠道黏膜和肠道内容物之间微生物多样性差异

较小, 3 个部位的优势菌门均以放线菌门、变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门和蓝藻门为主。已有众多针对不同鱼类体表黏液、肠道和不同养殖环境开展的单一或两者之间的微生物菌群结构研究^[10-12], 但鲜见对鱼类体表黏液、肠道以及养殖水环境三者之间联合开展的菌群结构和动态分析研究。

长江鲟 (*Acipenser dabryanus*) 是中国特有鱼类, 主要分布于长江上游干流以及部分重要支流^[13]。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, 已被国际自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 列为极危级 (CR) 物种。对长江鲟开展科学、有效的人工养殖工作仍是维持其种群数量的关键。本研究采用 Illumina 高通量测序技术, 探究了长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及其养殖水体的微生物菌群组成、多样性及动态变化, 以期为长江鲟幼鱼的健康养殖和病害分析提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用长江鲟幼鱼由中华鲟研究所 2022 年春季自主繁育。2022 年 6—9 月单养在直径 4 m、水深 0.8 m 的圆形流水养殖池。水源为井水和塘水混合水, 6、7 和 9 月每日投喂 2 次鲟鱼配合饲料, 投喂量约为鱼体质量的 1%; 8 月水温升高, 调整为每日投喂 1 次鲟鱼配合饲料, 投喂量约为鱼体质量的 0.5%。养殖期间每日排污 2 次, 换水量约为 20%, 每周开展常规水质监测。

1.2 样品采集

春夏季节, 水温适宜, 各种病原体容易滋生繁殖, 是鱼类疾病的高发期。2022 年 6—9 月期间, 每月对长江鲟幼鱼开展一次体表黏液、肠道内容物及其养殖水体样品的采集工作, 每种样品设置 6 个平行。黏液样品和肠道内容物样品的采集方法为: 随机挑取 6 尾鱼, 在 2 mL 无菌 EP 管中加入 1 mL 无菌水, 用无菌镊轻轻刮取鳍条、腹部、体侧及背

部黏液与无菌水混合均匀, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备测。随后, 用75% (φ) 乙醇棉球对鱼肛门、腹部及体侧进行消毒, 用无菌解剖剪从腹部剪开, 取出肠道, 用无菌 PBS 缓冲液冲洗3次, 无菌棉球擦拭干燥后将瓣肠、直肠肠道内容物置于2 mL 无菌 EP 管中, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备测。同时, 采集与黏液、肠道样品同时期的养殖水体样品, 采集方法为: 在养殖池3个对角线点分别用无菌水样采集袋采集500 mL 水样, 3个水样混合均匀, 用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜抽滤收集菌体, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备测。

1.3 16S rRNA 高通量测序

采集的全部样品于干冰保存送至上海美吉生物医药科技有限公司进行16S rRNA 高通量测序。具体流程如下: 利用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedical, 美国) 试剂盒提取黏液、肠道内容物及其水环境微生物总 DNA, 用1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。使用 V3—V4 变异区引物 (338F-806R) 进行 PCR 扩增, 产物经回收、纯化后进行定量和均一化处理, 构建文库并通过 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序。

1.4 数据处理及生物信息学分析

在美吉生物云平台完成数据处理及生物信息学分析工作。使用 Fastp 0.19.6 软件对测序得到的原始数据进行质控, 使用 Flash 1.2.11 软件进行拼接。使用 Uparse 11 软件根据97%的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。采用 PDR Classifier 2.13 软件对每条序列进行物种注释分类, 设置比阈值为70%, 比对 Silva 16S rRNA 数据库。按照最

小样本序列数对数据抽平处理后, 进行物种组成分析、Alpha 和 Beta 多样性分析、潜在病原菌分析及功能预测分析, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验开展指数间差异检验。

2 结果

2.1 测序结果分析

共计采集到长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物、养殖水体样品72个, PCR 扩增显示69个样品满足实验要求, 测序结果显示69个样品共计获得3 462 138 条高质量序列, 有效序列的平均长度为417 bp。对有效序列进行97%的相似性聚类, 可划分为4 349 个 OTUs, 鉴定出50 门、154 纲、381 目、632 科、1 306 属、2 360 种。各样品稀释曲线显示稀释曲线已到达平台期 (图1), 表明本次测序几乎已覆盖所有的细菌, 可真实反映出细菌的群落结构和多样性。

2.2 多样性分析

Venn 图分析显示, 长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物和养殖水体共有 OTUs 数量为485 个, 养殖水体特有 OTUs 数量最多 (1 229 个), 黏液和肠道内容物特有 OTUs 数量相似, 分别为680 和691 个 (图2)。三者之间微生物多样性存在差异。Chao 指数和 Ace 指数显示, 黏液和肠道内容物微生物物种丰富度无显著性差异, 二者均极显著低于养殖水体 ($P<0.001$, 图3-a、3-b)。Shannon 指数和 Simpson 指数显示, 养殖水体微生物的物种多样性最高、黏液次之、肠道内容物最低 (图3-c、3-d)。基于

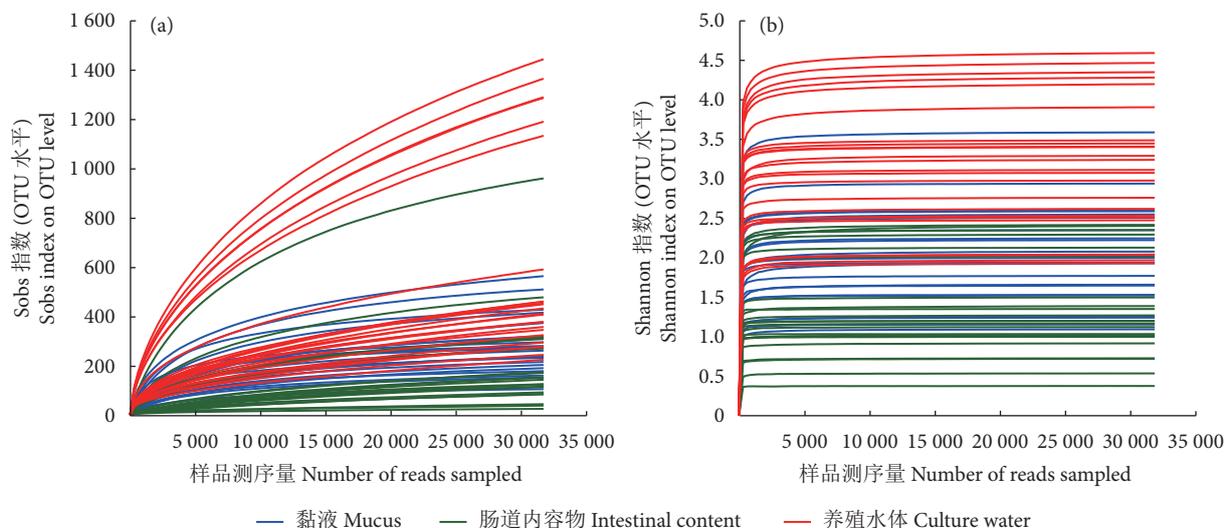


图1 样品稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves and Shannon curves of different samples

bray_curtis 的 PCoA 分析显示, 黏液和肠道内容物样本部分重叠 (图 4-a), 说明二者的菌群差异较小, 而养殖水体与二者间有一定距离, 说明它们之间的菌群具有差异。基于相同距离算法的样本层级聚类分析将样本明显分成 2 个簇 (图 4-b), 其中黏液和肠道内容物聚为一簇, 养殖水体单独为一簇, 表明黏液和肠道内容物菌群更为相似, 且可与养殖水体菌群区分开来。

2.3 物种组成及变化分析

在门水平, 长江鲟幼鱼黏液和肠道内容物微生物优势菌门较为相似, 均以放线菌门、变形菌门和厚壁菌门为主, 不同门类的排列顺序有所差异 (图 5-a、5-b)。6—9 月期间, 黏液微生物优势菌门变幅不大, 而肠道内容物微生物中梭杆菌门在 8 月明显增加, 在 9 月明显减少并趋于正常, 这可能与高温季节投喂频率和投喂量下降有关。养殖水体微

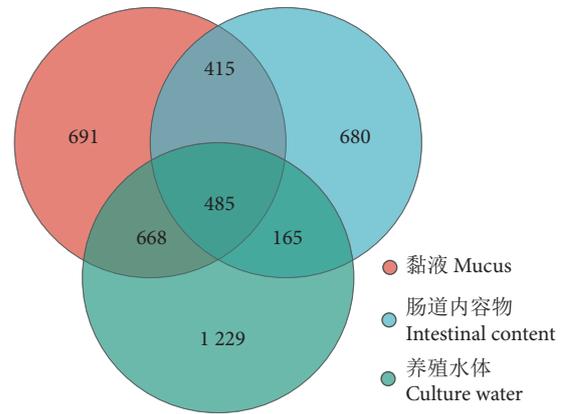


图2 黏液、肠道内容物及其养殖水体 OTUs 分布 Venn 图
Fig. 2 Venn diagram analysis of mucus, intestinal content and culture water

生物优势菌门依次为变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门, 与前两者优势菌门有所差异 (图 5-c)。6 月, 养殖水体中排名前三的优势菌门分别为变形菌门 (占

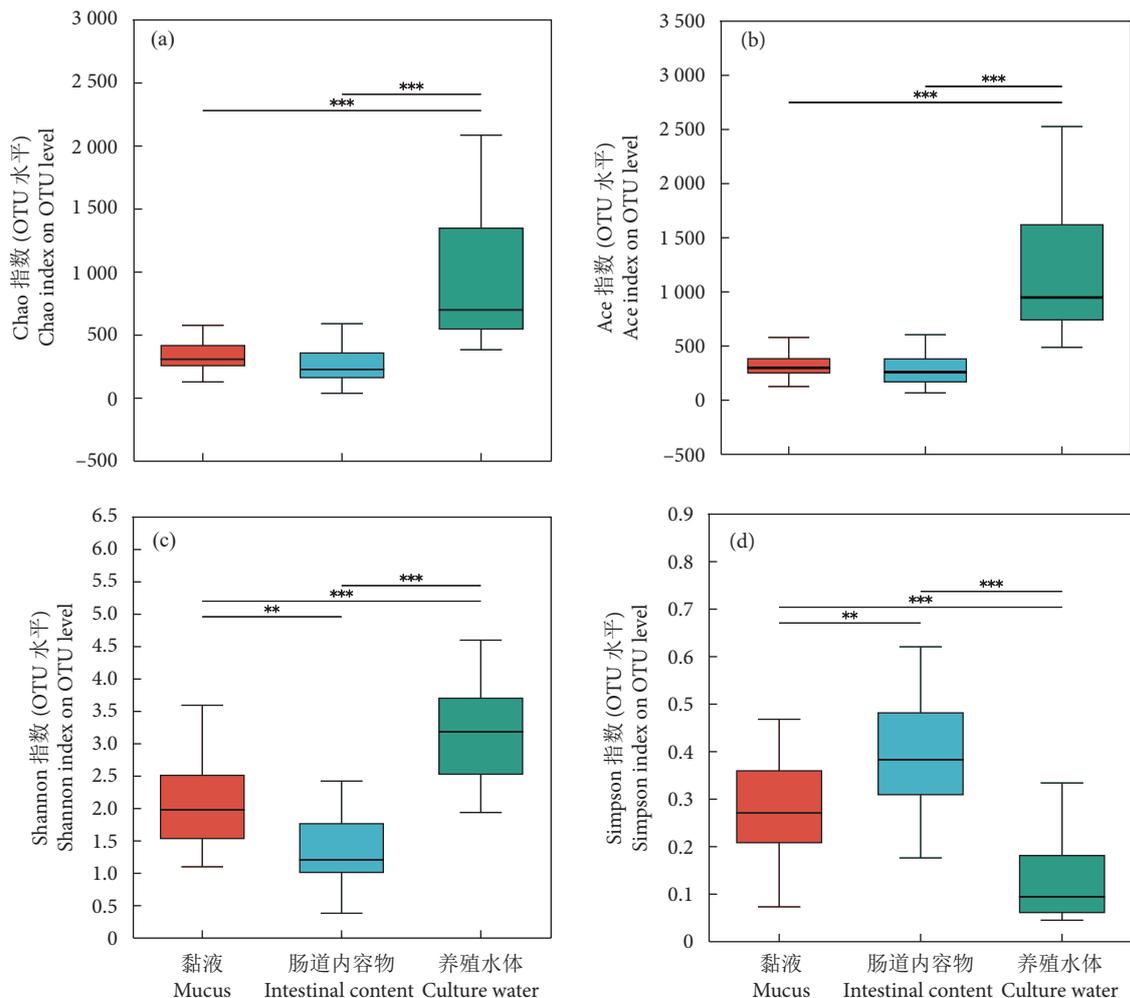


图3 黏液、肠道内容物及其养殖水体中微生物的 Alpha 多样性指数间差异检验

注: *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$ 。

Fig. 3 Alpha diversity difference of microorganism in mucus, intestinal content and culture water

Note: *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$.

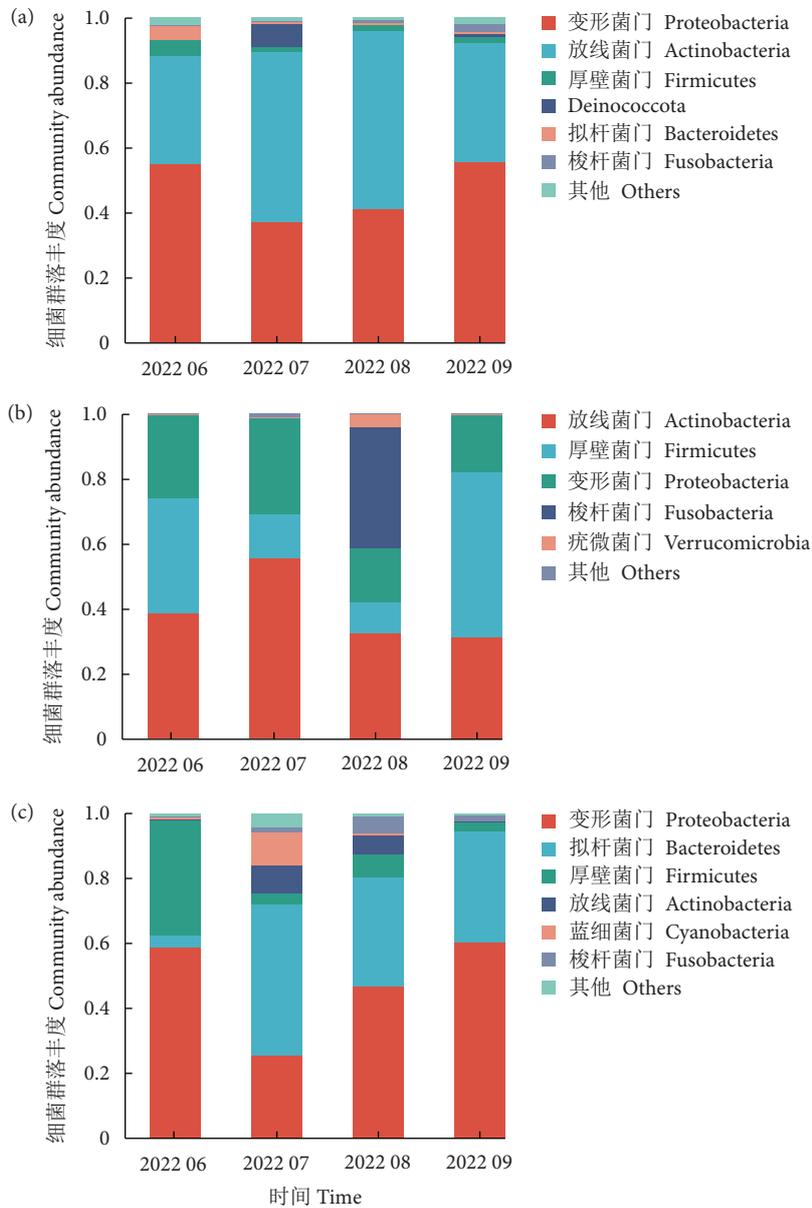


图5 黏液 (a)、肠道内容物 (b) 及养殖水体中 (c) 微生物在门水平的菌群结构组成

Fig. 5 Dominant species of bacteria in mucus (a), intestinal content (b) and culture water (c) on phylum level

可能与高温、枯水期水源改变有关。

在属水平，长江鲟幼鱼黏液优势菌群为红球菌属 (*Rhodococcus*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、不动杆菌属 (*Rhodococcus*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、不动杆菌属 (*Citrobacter*) 和叶杆菌属 (*Phyllobacterium*) (图 6-a)。6 月以红球菌属 (占比 31.25%)、叶杆菌属 (17.72%) 和不动杆菌属 (14.53%) 为主；7 月叶杆菌属、不动杆菌属占比降低，优势菌属变为以红球菌属 (51.13%) 和产碱菌属 (28.07%) 为主；8 月仍以红球菌属 (53.91%)、产碱菌属 (30.40%) 为主；9 月以红球菌属 (35.06%)、产碱菌属 (19.81%)、柠檬酸杆菌属 (16.16%) 和不动杆菌属 (13.11%) 为主。肠道内容物优势菌属为红球菌属、叶杆菌属、鲸杆菌属、乳球菌属 (*Lacto-*

coccus) 和 *Clostridium_sensu_stricto_1* (图 6-b)。6 月以红球菌属 (38.25%)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (26.69%) 和叶杆菌属 (24.95%) 为主；7 月 *Clostridium_sensu_stricto_1* 占比大幅下降，以红球菌属 (54.60%) 和叶杆菌属 (27.59%) 为主；8 月，随着投喂频率和投喂量的下降，鲸杆菌属成为第一大优势菌属 (37.43%)，其次为红球菌属 (32.20%)，叶杆菌属 (14.76%) 为第三大优势菌属；9 月，红球菌属恢复为第一优势菌属 (30.28%)，乳球菌属激增成为第二大优势菌属 (29.32%)，叶杆菌属为第三大优势菌属 (14.86%)。养殖水体中优势菌属为黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、不动杆菌属、乳球菌属和柠檬酸杆菌属 (图 6-c)。6 月以不动杆菌属 (45.37%) 和乳

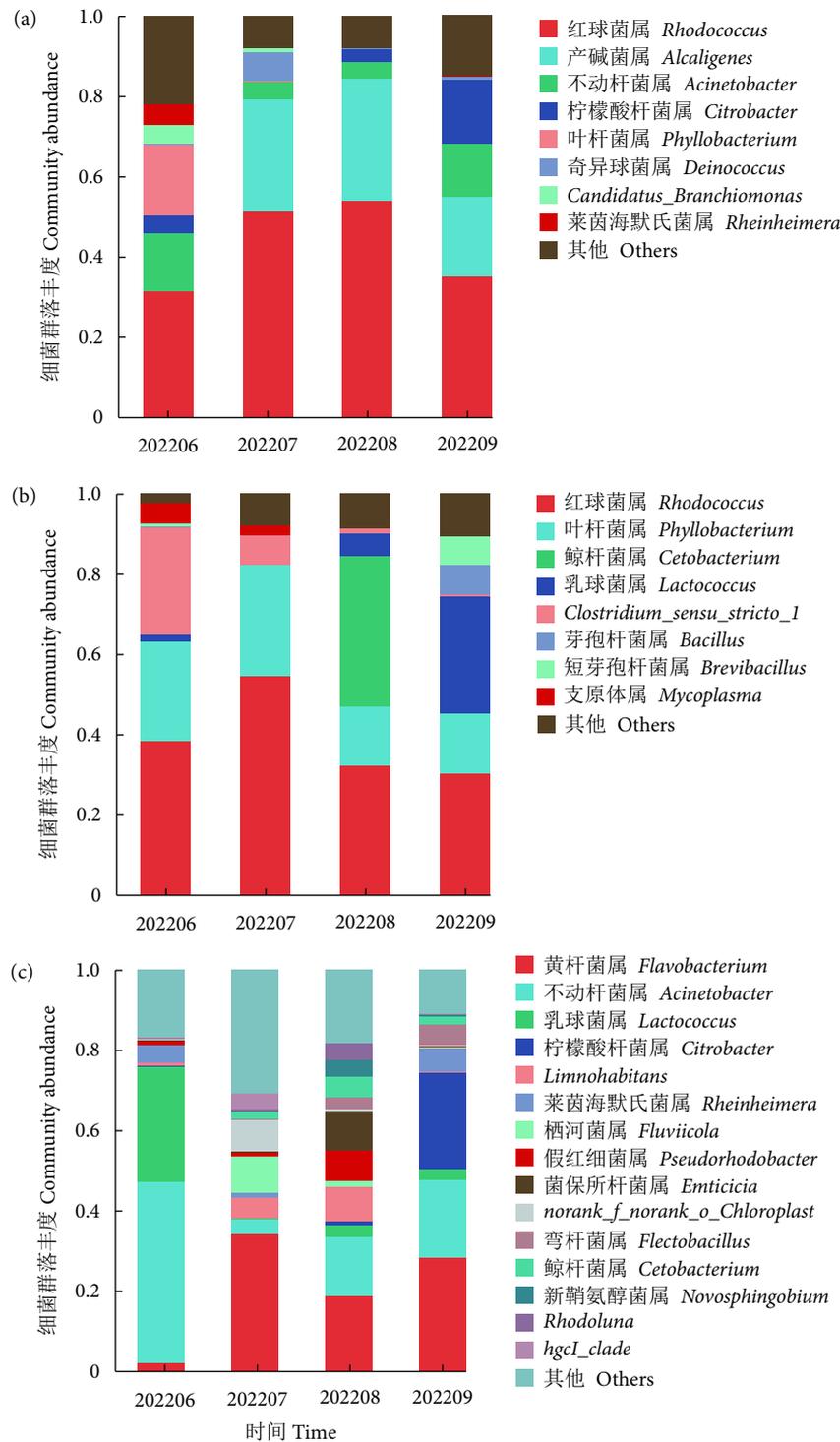


图6 黏液 (a)、肠道内容物 (b) 及养殖水体中 (c) 微生物在属水平的菌群结构组成

Fig. 6 Dominant species of bacteria in mucus (a), intestinal content (b) and culture water (c) on genus level

球菌属 (28.57%) 为主; 随着水温升高和枯水期水源改变, 7—8 月菌群种类更加丰富, 打破原有平衡, 黄杆菌属成为第一优势菌属; 9 月形成以黄杆菌属 (28.30%)、柠檬酸杆菌属 (24.12%) 和不动杆菌属 (19.40%) 为主的新平衡。

2.4 潜在病原菌的分析

对 OTU 丰度进行统计, 选择丰度前 50 个

OTUs 在属水平进行热图分析, 以展示潜在病原菌在黏液、肠道内容物和养殖水体中的分布情况 (图 7)。发现柠檬酸杆菌属、不动杆菌属、黄杆菌属、爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、邻单胞菌属 (*Plesiomonas*) 和气单胞菌属 (*Aeromonas*) 共计 7 种潜在病原菌属。养殖水体中潜在病原菌分布最广, 以柠檬酸杆菌属、不

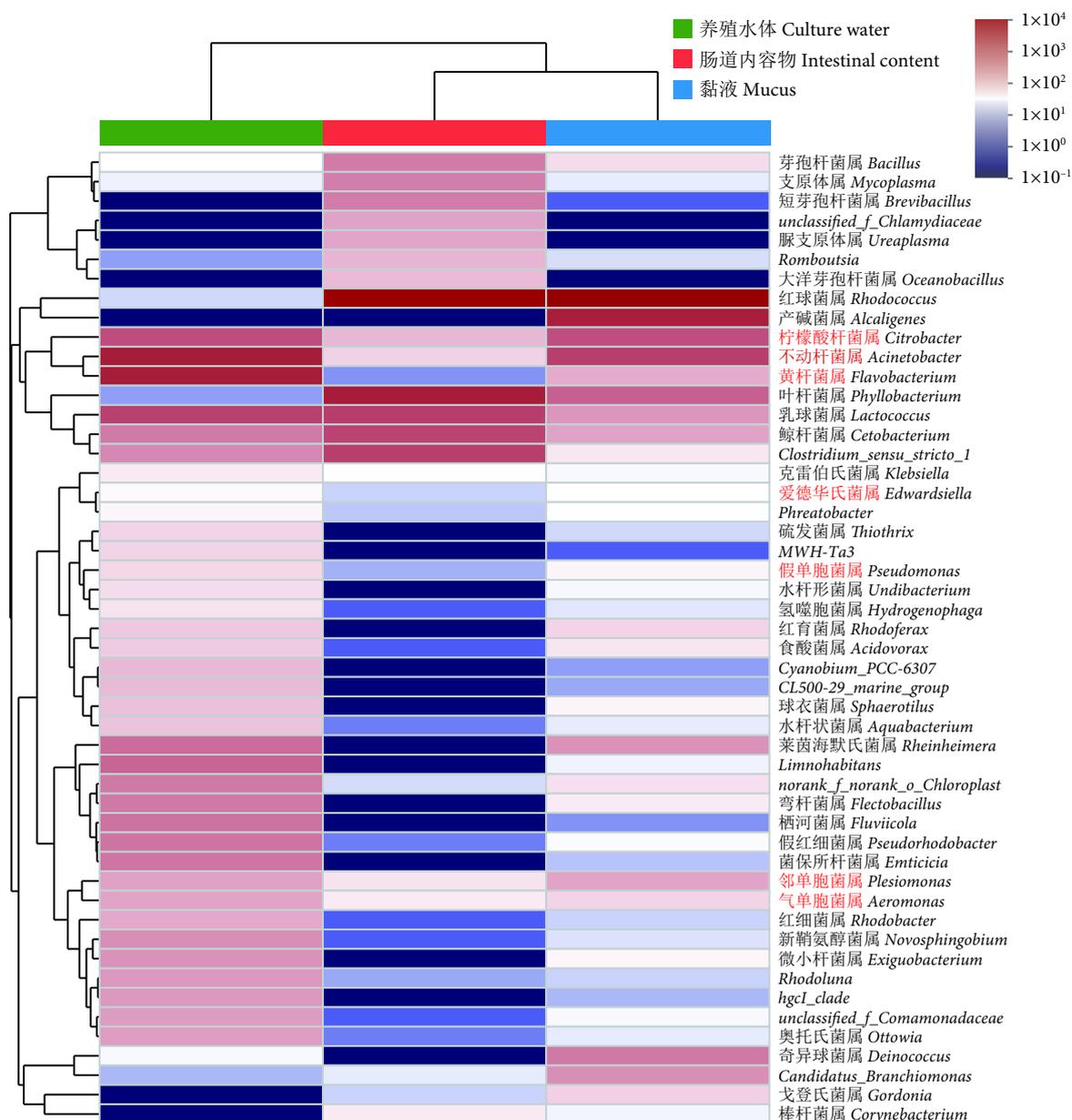


图7 属水平下黏液、肠道内容物及其养殖水体中微生物组成热图

Fig. 7 Heatmap of microbial communities in mucus, intestinal content and culture water on genus level

动杆菌属、黄杆菌属、邻单胞菌属和气单胞菌属为主；黏液次之，以柠檬酸杆菌属、不动杆菌属和邻单胞菌属为主；肠道内容物中各病原菌属分布较窄。

2.5 表型预测分析

为进一步了解长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及养殖水体微生物菌群的功能轮廓，利用 BugBase 对细菌表型进行预测。BugBase 表型预测分析开展了革兰氏阳性、革兰氏阴性、厌氧、兼性厌氧、好氧和潜在致病性共计 6 种表型特征。结果显示，肠道内容物以革兰氏阳性菌为主（占比 62.57%，图 8-a），黏液和养殖水体以革兰氏阴性菌为主，分别占

比 59.70% 和 71.18%（图 8-b）。在厌氧菌组成方面，肠道内容物厌氧菌丰度最高，养殖水样次之，黏液厌氧菌丰度最低（图 8-c）；在兼性厌氧菌组成方面，养殖水体兼性厌氧菌显著高于黏液和肠道内容物（图 8-d）；在好氧菌组成方面，黏液好氧菌丰度为 79.87%，肠道内容物为 62.73%，养殖水体为 37.31%（图 8-e）。有潜在致病性的菌群主要富集在养殖水体和黏液中，远高于肠道内容物（图 8-f）。

3 讨论

微生物是生命世界中丰富多样的生物资源，不

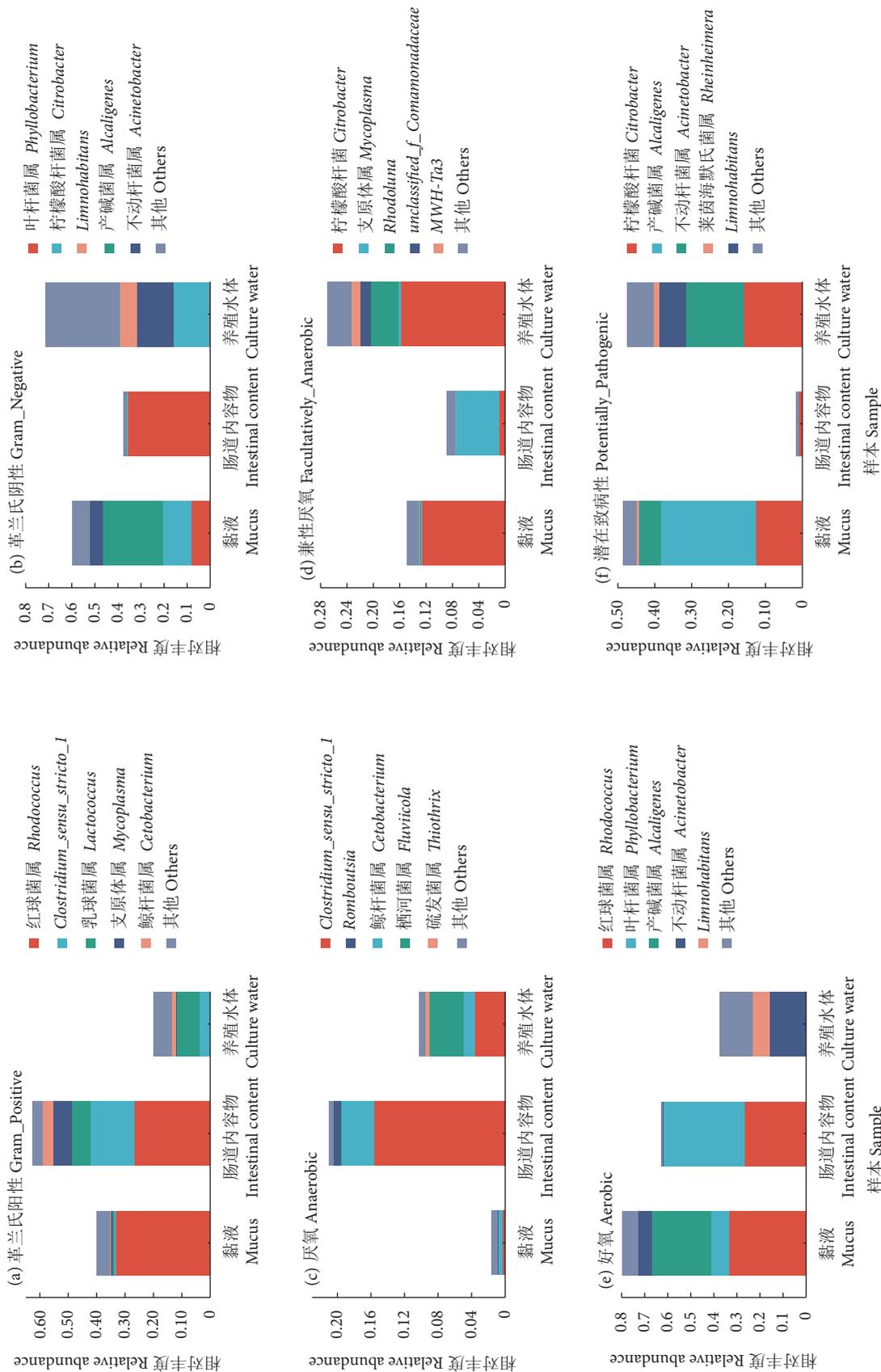


图8 利用 BugBase 对黏液、肠道内容物及养殖水体中微生物菌群表型进行预测分析

Fig. 8 Phenotype analysis of bacteria in mucus, intestinal content and culture water by BugBase

同来源的微生物表现出不同的菌群结构和特征。本研究对长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及养殖水体的微生物菌群结构进行分析,结果显示三者间的菌群结构兼具相似性和差异性。鱼类表皮细胞分泌大量黏液,其微生物群落结构会受到物种、饵料、发育进程以及健康状态的影响,但这些影响随着宿主发育而逐渐减弱^[14]。鱼类体表黏液根据自身需要建立特定菌群,并在特定发育时期保持相对稳定^[15]。研究认为鱼类黏液微生物菌群结构和功能与肠道具有相似性^[16]。本研究中,Alpha和Beta多样性分析表明黏液和肠道内容物微生物菌群结构更为相似,且可与养殖水体微生物菌群区分开来。推测可能是鱼类体表黏液和肠道与机体互利共存、相互作用的结果。养殖水体中存在大量的微生物,它们参与各项物质循环,维持整个养殖系统的生态平衡^[17]。研究表明,斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)^[18]、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[19]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)^[20]肠道的微生物多样性低于养殖水体。本研究结果与上述结果一致,Alpha多样性分析结果显示,长江鲟幼鱼肠道内容物中微生物的菌群丰富度和多样性低于同时期养殖水体,且差异显著($P < 0.001$)。

在门水平,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体表黏液以变形菌门和拟杆菌门为主^[21];小头裸裂尻鱼体表皮的优势菌门为放线菌门和变形菌门^[9]。变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门是大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肠道菌群的优势菌门^[22];变形菌门、放线菌门和拟杆菌门是玫瑰高原鳅(*Triplophysa rosa*)肠道的主要菌群^[23];变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门是石首鱼(*Aplodinotus grunniens*)肠道的优势菌门^[24]。本研究发现,长江鲟幼鱼黏液和肠道内容物的优势菌门较为相似,均为放线菌门、变形菌门和厚壁菌门,与上述学者的研究结果有所差异。可能是由于不同组织来源、不同种类的微生物菌群因其宿主特征、饵料种类、组织特性不同,其优势菌门会呈现不同组成变化。本研究显示6—9月期间各门类比例呈现动态变化,其中黏液动态变幅不大,而肠道内容物在8月出现梭杆菌门明显增加,9月明显下降恢复正常的现象。这可能与8月水温升高降低日投喂量和投喂频率,9月恢复正常投喂有关。这提示我们改变投喂策略可以直接影响肠道优势菌门的组成。

在门水平对养殖水体优势菌群进行研究,结果表明辽宁长海刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池水体^[25]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)异养、自养型生物絮团^[26]以变形菌门和拟杆菌门为主;4种鲟鳇网箱养殖水体优势菌门由变形菌门、放线菌门和拟杆菌门等组成^[27]。本研究养殖水体中变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门占优势地位,与上述结果相一致。同时,本研究发现养殖水体随外界因素影响呈现动态变化。6月,优势菌门排列由高到低依次为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。7月,枯水期水源改变导致拟杆菌门成为第一优势菌门,变形菌门降至第二。9月,水源逐步趋于稳定,形成以变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门为主的新平衡状态。变形菌门是细菌中最大的一个门,具有利用碳源,去除氮与磷,降解有机物等作用^[28-29]。拟杆菌门作为第二优势菌门,在降解生物大分子、发酵碳水化合物、参与碳循环等方面具有重要作用^[30-31]。

在属水平,长江鲟体表黏液优势菌属为红球菌属、产碱菌属、不动杆菌属、柠檬酸杆菌属和叶杆菌属;肠道内容物优势菌属为红球菌属、叶杆菌属、鲸杆菌属、乳球菌属和*Clostridium_sensu_stricto_1*;养殖水体中优势菌属为黄杆菌属、不动杆菌属、乳球菌属和柠檬酸杆菌属。其中黏液和肠道内容物共同优势菌属2个,且第一优势菌属相同,黏液和养殖水体共同优势菌属2个,肠道内容物和养殖水体共同优势菌属1个。鱼体黏液与水环境密切接触,水环境中含有复杂多样的微生物群落,但物种组成分析结果和多样性结果均显示黏液与养殖水体的相似性低于其与肠道的相似性。推测产生此现象的原因有两种:1)黏液作为机体的第一道防御屏障,含有大量的土著微生物,水环境中的微生物难以定殖成功,其在水环境中会选择自身需要的微生物并构建特定的群落;2)黏液和肠道共同与宿主互相作用、互相影响,宿主利用各种防御机制将二者中的微生物群落维持在一定的范围,以保障机体健康生长。

水产养殖中,细菌性疾病是制约养殖成活率的一大瓶颈^[32-33]。众所周知,条件病原菌广泛存在于养殖环境和鱼体内外,当鱼体体质下降或外界环境恶化极易导致病害的发生。已报道的鲟鱼病害研究显示,柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)可导致中华鲟(*A. sinensis*)患烂鳃病^[34];嗜水气单孢菌

(*Aeromonas hydrophila*)^[35-36]、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)^[37]、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)^[38]、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)^[39] 可导致西伯利亚鲟 (*A. baerii*)、达氏鲟、中华鲟患细菌性败血症; 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 可导致杂交鲟 (*Huso dauricus*♀×*Acipenser schrenckii*♂) 患肠炎病^[40]; 停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)^[41]、海豚链球菌 (*S. iniae*)^[42] 可导致俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedti*)、波斯鲟 (*A. persicus*) 患链球菌病; 偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)^[43]、龟分枝杆菌 (*M. chelonae*)^[44]、海分枝杆菌 (*M. marinum*)^[45] 可导致小体鲟 (*A. ruthenus*)、俄罗斯鲟、中华鲟患分枝杆菌病。本研究通过对丰度前 50 个 OTUs 在属水平进行热图分析, 发现潜在病原菌在长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及养殖水体中普遍存在, 共计发现 7 个潜在病原菌属: 柠檬酸杆菌属、不动杆菌属、黄杆菌属、爱德华氏菌属、假单胞菌属、邻单胞菌属和气单胞菌属。提示在养殖过程中容易发生烂鳃病、肠炎病和细菌性败血症。潜在病原菌在三者之间的分布关系为养殖水体最广、黏液次之、肠道内容物最窄, 表明在适宜的条件下, 潜在病原菌可能会由外向内导致上述疾病的发生。

通过 BugBase 对细菌表型进行预测分析发现, 长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及养殖水体中存在革兰氏阴性菌和阳性菌。其中肠道内容物的优势菌群为革兰氏阳性菌, 占比超过 60%; 黏液和养殖水体的优势菌群均为革兰氏阴性菌, 占比分别为 60% 和 70%。研究发现达氏鳊 (*Huso dauricus*)^[46] 和大泷六线鱼幼鱼^[47] 肠道中革兰氏阳性菌分别占比 80% 和 56%, 与本研究结果相似。这与梭菌属、乳球菌属等革兰氏阳性菌的功能有关, 它们可以在肠道中发酵碳水化合物、利用蛋白质和糖分, 帮助鱼类从饵料中获取营养和能量^[48-49]。已有研究显示小头裸裂尻鱼皮肤黏膜微生物中革兰氏阴性菌占比约为 50%^[9], 南极中山站上层海水微生物中革兰氏阴性菌占比约为 60%^[14], 二者革兰氏阴性菌比例均小于本研究, 这可能与物种、水源以及发育进程的影响相关。在氧气需求方面, 黏液和肠道内容物以好氧菌为主; 养殖水体以好氧菌和兼性厌氧菌为主。与黏液和养殖水体相比, 肠道内容物中含有更多的厌氧菌, *Clostridium_sensu_stricto_1* 在肠道厌氧菌中占比超过 70%, 成为优势菌属。

Clostridium_sensu_stricto_1 具有促进短链脂肪酸 (SCFAs) 产生, 改善肠道微生物结构的作用^[50]。在人类医学研究中发现, *Clostridium_sensu_stricto_1* 可以通过阻碍病原微生物的定殖进而增强婴儿肠道中细菌的耐药性^[51]。潜在致病性菌群在养殖水体和黏液中占比均超过 45%, 远远高于肠道内容物 (0.2%)。由此可见, 养殖水体和黏液中存在大量的条件致病菌, 当鱼体处于应激状态或养殖环境恶化时, 可能导致病害的发生。

4 结论

本研究利用高通量测序技术对长江鲟幼鱼黏液、肠道内容物及养殖水体的微生物多样性进行了研究。发现养殖水体的微生物多样性最高、黏液次之、肠道内容物最低。黏液和肠道微生物菌群结构更为相似, 且可与养殖水体微生物菌群区分开来。养殖水体和黏液中存在大量的潜在致病菌, 当鱼体处于应激状态或养殖环境恶化时, 可能导致病害的发生。

致谢: 衷心感谢三峡金沙江川云水电开发有限公司柯伟主任在本研究过程中给予的支持与帮助!

参考文献:

- [1] ELLIS A E. Immunity to bacteria in fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9(4): 291-308.
- [2] GUARDIOLA F A, CUESTA A, ARIZCUN M, et al. Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(2): 545-551.
- [3] LYONS P P, TURNBULL J F, DAWSON K A, et al. Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. Aquac Res, 2017, 48(5): 2438-2452.
- [4] GUPTA V K, KIM M, BAKSHI U, et al. A predictive index for health status using specieslevel gut microbiome profiling[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4635.
- [5] GADOIN E, DURAND L, GUILLOU A, et al. Does the composition of the gut bacteriome change during the growth of tuna?[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1157.
- [6] GIATIS C, SIPKEMA D, SMIDT H, et al. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae[J]. Sci Rep, 2015(5): 18206.
- [7] 丁红秀, 李忠莹, 刘俊, 等. 不同生境草鱼肠道微生物组成和群落特征分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(3): 729-739.
- [8] 樊英, 于晓清, 李乐, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序分析大泷六

- 线鱼表皮粘液及肠道内容物微生物多样性 [J]. 生物技术进展, 2021, 11(1): 79-90.
- [9] 郝佳慧, 蔡伟杰, 李柯懋, 等. 高通量测序分析小头裸裂尻鱼皮肤和肠道的微生物多样性 [J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 233-250.
- [10] 陈奇, 宋协法, 周广军, 等. 鲟鱼循环水养殖系统中生物滤池的水质变化及微生物群落结构响应 [J]. 中国海洋大学学报, 2022, 52(11): 56-66.
- [11] 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.
- [12] 叶建勇, 唐金玉, 丁辰龙, 等. 基于高通量测序的克氏原螯虾肠道及其养殖环境菌群结构分析 [J]. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 2020, 37(2): 129-134.
- [13] 孙立元, 危起伟, 张辉, 等. 基于水声学的长江上游向家坝至宜宾江段鱼类空间分布特征 [J]. 淡水渔业, 2014, 44(1): 53-58.
- [14] 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: 7-121.
- [15] STEPHENS W Z, BURANS A R, STAGAMAN K, et al. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development[J]. ISME J, 2016, 10(3): 644-654.
- [16] LIU Q F, LAI Z N, GAO Y, et al. Connection between the gut microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and microbiota of the pond culture environment[J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1770.
- [17] 李革雷, 陈昌福, 高宇, 等. 3 种养殖模式水体中细菌多样性研究 [J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 381-390.
- [18] 熊向英, 赵艳飞, 王志成, 等. 斑点叉尾鲟肠道及其养殖环境菌群结构分析 [J]. 水产科学, 2022, 41(4): 589-596.
- [19] 吴欢欢, 王伟继, 吕丁. 应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构 [J]. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 84-94.
- [20] 张琛, 王岩, 郑峡飞, 等. 海水网箱养殖花鲈和日本黄姑鱼肠道细菌的多样性 [J]. 中国水产科学, 2020, 27(9): 1113-1124.
- [21] LOWREY L, WOODHAMS D C, TACCHI L, et al. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin[J]. Appl Environ Microb, 2015, 81(19): 6915-6925.
- [22] 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): 2798-2802.
- [23] 刘妮, 彭作刚. 玫瑰高原鳅肠道微生物多样性研究 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(1): 118-124.
- [24] HUANG Q, SHAM R C, DENG Y, et al. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors[J]. Mol Ecol, 2020, 29(24): 5019-5034.
- [25] 谭八梅, 王萃, 裴泓霖, 等. 不同季节刺参养殖池塘水样菌群结构与功能特征研究 [J]. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 77-88.
- [26] 高远, 李蕊, 董登攀, 等. 凡纳滨对虾养殖系统中异养和自养型生物絮团的微生物特性及其与养殖水环境的关系 [J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 864-873.
- [27] 黄薇, 周华书, 刘兰英, 等. 鲟鳇鱼网箱养殖环境微生物菌群结构及潜在病原菌分析 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(6): 1255-1263.
- [28] COTTRELLI M T, KIRCHMAN D L. Nature assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low-molecular and high-molecular weight dissolved organic matter[J]. Appl Environ Microb, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [29] KLASE G, LEE S, LIANG S, et al. The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: implications of environmental public health[J]. Sci Total Environ, 2019, 649: 1491-1501.
- [30] 施云芬, 郑蕾, 马慧, 等. 脉冲水解酸化-A/O 生物反应器处理石化废水的中试研究及微生物群落结构解析 [J]. 科技导报, 2017, 35(23): 39-45.
- [31] CHEN J, ROBB C S, UNFRIED F, et al. Alpha- and beta-mannan utilization by marine *Bacteroidetes*[J]. Environ Microbiol, 2018, 20(11): 4127-4140.
- [32] 高晓华, 张海强, 安伟. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病致病菌的分离鉴定、药敏特性及其组织病理学观察 [J]. 淡水渔业, 2022, 52(3): 82-90.
- [33] 徐春霞. 网箱养殖大黄鱼内脏白点病病原菌分离鉴定及致病性研究 [J]. 水产科学, 2021, 40(5): 670-678.
- [34] 张建明, 田甜, 张德志. 中华鲟幼鱼细菌性烂鳃病的诊断与治疗 [J]. 水产科技情报, 2017, 44(5): 245-247.
- [35] DI J, ZHANG S H, HUANG J, et al. Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicaemia in cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. Aquac Res, 2018, 49(11): 3624-3633.
- [36] 王文龙. 嗜水气单胞菌在西伯利亚鲟体内的分布及其引起的病理学变化 [D]. 成都: 四川农业大学, 2010: 28-35.
- [37] 刘亚, 杨锐, 陈叶雨, 等. 达氏鲟维氏气单胞菌的分离鉴定及病理组织学观察 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(6): 1235-1241.
- [38] YANG R, LIU Y, WANG Y, et al. Pathogenesis and pathological analysis of *Edwardsiella tarda* from Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in China[J]. Aquaculture, 2018, 495: 637-642.
- [39] 杨移斌, 夏永涛, 赵蕾, 等. 鲟源弗氏柠檬酸杆菌分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(4): 766-771.
- [40] 杨圆圆, 杨移斌, 曹海鹏, 等. 杂交鲟源恶臭假单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 浙江农业学报, 2017, 29(12): 1978-1985.
- [41] 杨移斌, 杨秋红, 刘永涛, 等. 俄罗斯鲟停乳链球菌停乳亚种分离、鉴定及其药敏特性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(9): 717-721.
- [42] SHARIFPOUR I, SOLTANI M, MAZANDARAN M. Histopathological features of infection by *Streptococcus iniae* in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*[J]. J Aquat Anim Health, 2020, 6(2): 39-48.
- [43] PATE M, JENCIC V, ZOLNIR-DOVC M, et al. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 64(1): 29-35.
- [44] ANTUOFERMO E, PAIS A, NUVOLI S, et al. *Mycobacterium*

- chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. BMC Vet Res, 2014, 10: 18.
- [45] ZHANG Q Q, WANG X H, ZHANG D F, et al. *De novo* assembly and analysis of Amur sturgeon (*Acipenser schrenkii*) transcriptome in response to *Mycobacterium marinum* infection to identify putative genes involved in immunity[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1324-1334.
- [46] 阮瑞, 吴金平, 李莹, 等. 人工养殖下达氏鳢幼鱼肠道菌群组成分析 [J]. 淡水渔业, 2018, 48(5): 93-98.
- [47] 樊英, 王友红, 姬广磊, 等. 基于宏基因组测序技术揭示大泷六线鱼肠道微生物特征 [J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 357-375.
- [48] KIM M, QIE Y, PARK J, et al. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(2): 202-214.
- [49] SPOR A, KOREN O, LEY R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(4): 279-290.
- [50] 王艳芳. 滇黄精多糖改善大鼠脂代谢紊乱的作用研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2017: 41-52.
- [51] LOUIS P, FLINT H J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 294(1): 1-8.