



· 综述 ·

鱼类黏膜层微生物研究进展

张艳敏^{1,2,3}, 杨国坤^{1,2,3}, 李克克³, 孟晓林^{1,2,3*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

3. 河南金百合生物科技股份有限公司, 河南 新乡 453007)

摘要: 鱼类黏膜层(主要为皮肤、鳃、肠道等部位)及其共生微生物在调节鱼类黏膜层微环境稳态、促进鱼体健康方面发挥重要作用。近 10 年来, 鱼类肠道黏膜层微生物因其在鱼体营养和健康方面具有重要作用而备受关注, 而人们对于其他部位黏膜层(如皮肤、鳃)共生微生物的研究却相对滞后。为更好地了解鱼类黏膜层微生物与鱼体健康的关系, 本文结合近年来的研究结果, 对鱼类黏膜层微生物的群落特征、与宿主的相互作用、影响因素、研究策略和应用价值等方面对鱼类黏膜层微生物的研究现状和存在问题进行综述, 旨在为鱼类黏膜层微生物未来研究的发展方向, 及其在生产、实践方面的应用提供理论参考。

关键词: 鱼类; 黏膜层微生物; 群落结构; 影响因素; 研究策略; 应用价值

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

鱼类黏膜层(主要包括皮肤、鳃、肠道等)及其共生微生物是宿主与外界环境接触的第一道屏障, 并在宿主的健康和免疫中发挥关键作用^[1]。在鱼类黏膜层共生微生物的研究中, 肠道菌群在宿主营养与健康方面的重要作用已被证实^[2-6]。相比于肠道菌群, 人们对于皮肤、鳃等与水环境广泛接触的黏膜层共生微生物与宿主的关系却了解甚少^[7-8]。与肠道微环境类似, 存在于皮肤、鳃等部位的共生微生物也可通过持续和频繁的物质交换、能量流动和信号传递来维持黏膜层微环境的稳态, 进而调节宿主健康状态^[9-11]。因此, 深入探究鱼类黏膜层微生物群落结构及其与宿主、环境的互作关系, 将为有效调控鱼类健康水平和新型益生菌的开发、利用提供新的视野和途径。

1 鱼类黏膜层微生物群落特征

鱼类黏膜层不仅具有多种免疫相关因子(如

黏蛋白、抗菌肽、免疫球蛋白等), 还拥有大量的共生微生物群, 这些微生物在机体发育、体内微环境平衡和抵抗病原菌入侵方面具有重要作用, 使其成为宿主的“额外器官”^[12]。不同部位的黏膜层共生微生物群落差异构成了它们特有的生态位, 可通过调节黏膜层微环境的稳态, 进而促进宿主的营养与健康^[13-15]。

1.1 鱼类黏膜层微生物的群落结构

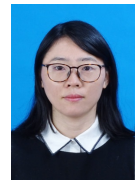
鱼类黏膜层共生微生物种类丰富、多样, 总体来看, 大多属于细菌域(Bacteria)的变形菌门(Proteobacteria), 其他类群微生物如拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteria)等同样属于鱼类黏膜层微生物中的优势类群(图 1)^[16]。相对于细菌域, 人们针对鱼类黏膜层中真菌域(Fungi)和古菌域(Archaea)微生物的研究相对较少。

收稿日期: 2021-05-17 修回日期: 2021-06-11

资助项目: 国家自然科学基金(U1904118); 河南省重点科技攻关项目(202102110259); 河南省自然科学基金(212300410174)

第一作者: 张艳敏(照片), 从事微生物生态学研究, E-mail: Zhang_Yanmin2019@163.com

通信作者: 孟晓林, 从事益生菌与鱼类健康、糖脂代谢和免疫相关研究, E-mail: mengxiaolinqdio@126.com



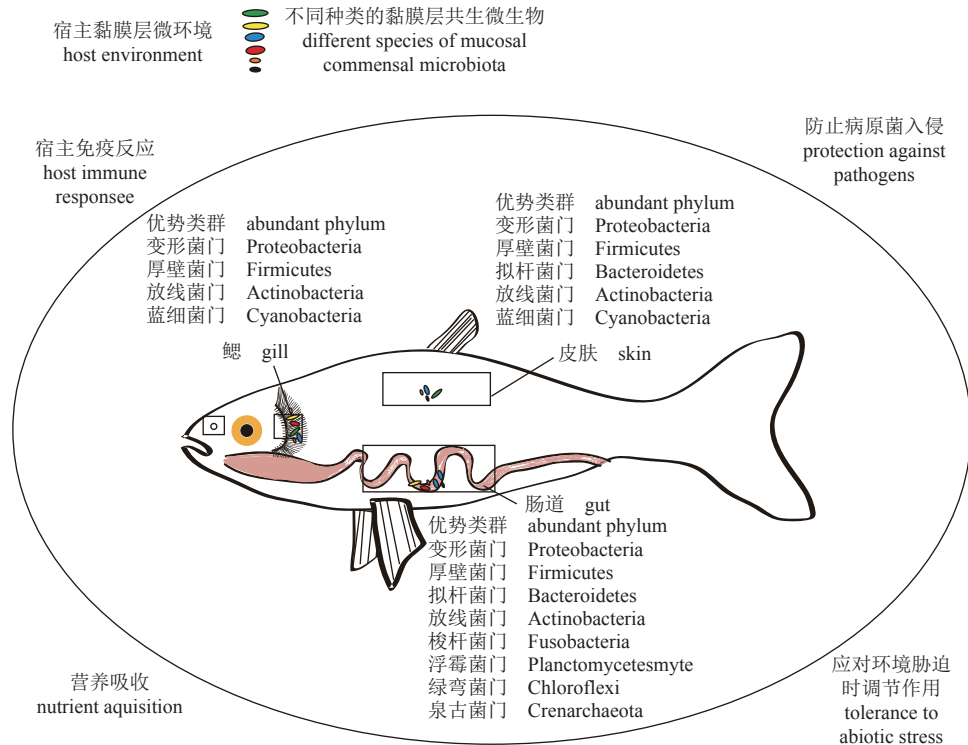


图 1 鱼类黏膜层微生物 (优势门) 及其对于宿主的调节作用^[16]

Fig. 1 Mucosal layer microorganisms (abundant phylum) of fish and their regulatory effects on the host

迄今为止, 已报道的鱼类黏膜层真菌主要包括子囊菌门 (Ascomycota), 古菌域主要包括广古菌门 (Euryarchaeota) 和泉古菌门 (Crenarchaeota) 等 (图 1)。

鱼类不同部位黏膜层微生物群落结构存在明显差异^[15]。由于鱼类的皮肤和鳃始终暴露于水环境中, 皮肤和鳃黏膜层拥有更多的好氧微生物 (如放线菌门等), 而肠道作为环境相对稳定的内部器官, 含有更多的兼性或严格厌氧微生物 (如梭杆菌门等)。在不同部位的黏膜层微环境中, 变形菌门、厚壁菌门和放线菌门为共存的优势类群, 拟杆菌门在皮肤和肠道黏膜层中较丰富, 蓝细菌门是皮肤和鳃黏膜层共有的优势类群 (图 1)^[15-16]。有研究通过培养方法预估, 鱼类皮肤黏膜层微生物含量为 $10^2 \sim 10^4$ CFU/cm², 鱼类的鳃组织微生物含量为 $10^3 \sim 10^6$ CFU/g, 而鱼类肠道每克组织中含有 10^8 个异养细菌和 10^5 个厌氧细菌^[17]。

人们对鱼类肠道黏膜层微生物的研究较为深入, 研究内容涵盖鱼类品种差异、食性差异、生存环境差异等, 而有关皮肤、鳃黏膜层微生物的研究主要集中在野生鱼类, 如白斑红点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*)、白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 等^[18-21], 或是少数养殖鱼类, 如尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、青石

斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 等^[22-25], 这些研究主要关注皮肤和鳃黏膜层微生物的群落结构组成, 而对黏膜层微生物与宿主的互动尚缺乏深层次的探讨。

1.2 鱼类黏膜层微生物的类群划分

根据微生物的定居方式, 可将鱼类黏膜层微生物分为两大类群: 土著菌群 (“原地居民”) 和过路菌群 (“外来居民”)^[26]。土著菌群可以黏附并定殖在黏膜层表面或上皮组织内, 与宿主具有共生关系^[27]。例如, 在肠道黏膜层中, 它们对胆汁酸和胃液环境的低 pH 值具有极强的耐受性。在皮肤黏膜层中, Lowrey 等^[15]通过共聚焦显微镜观察到虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 皮肤黏膜层微生物与上皮细胞和杯状细胞都有关联, 定殖部位靠近上皮顶端部分和上皮深部。

根据微生物种群的相对丰度, 又可将微生物划分为优势菌群 (abundant species) (或核心种群, core taxa) 和稀有种群 (rare species), 优势类群可能在微生物群落功能和宿主的生理、生化调节中发挥重要的作用, 群落也更加稳定, 而稀有种群可能具有某些特有的生物学功能^[28-31]。在鱼类黏膜层微生物的研究中, 人们大多关注优势种群, 即

相对丰度较高的种群(相对丰度大于5%或1%)或相对丰度排名靠前的门、属等分类单元,但目前研究者们对优势种群尚无统一论^[29,32]。虽然稀有种群在鱼类黏膜层微生物研究中的关注度较低,但已有研究发现,作为尼罗罗非鱼肠道内分离出来的非优势菌——柠檬酸杆菌(*Citrobacter* spp.)可以通过影响鱼肠道的整体菌群,进而影响尼罗罗非鱼的能量收支平衡和脂肪沉积,这也证实非优势菌群在肠道微生态平衡中的重要性^[33]。可见,从微生物生态学的角度来讲,一个健康的微生物群落是由优势种群、非优势种群或稀有种群等多种微生物组成的有机整体,能够抵抗任何内部或外部因素压力,进而维持宿主生态环境平衡和稳定^[1,17]。因此,对鱼类黏膜层微生物类群(包括优势和稀有种群)组成、生态网络结构和功能的深入探究是研究调控鱼体健康的关键途径。

2 鱼类黏膜层微生物与宿主的相互作用

鱼类黏膜层微生物群落是宿主黏膜防御屏障的重要组成部分,与宿主共同调节黏膜层微环境的生态平衡(图1)。鱼类黏膜层微生物主要通过竞争黏附位点、营养物质和空间,从而限制或减少病原体的丰度;或通过产生各种黏膜层物质,如有机酸、铁载体、细菌素、H₂O₂、抗菌肽等来拮抗病原菌^[17,34]。因此,鱼类不同部位黏膜层微生物类群的差异与其生理功能息息相关。

2.1 鱼类肠道黏膜层微生物与宿主的相互作用

在鱼类黏膜层微生物与宿主相互调节作用的研究中,鱼类肠道黏膜层微生物是目前研究最为广泛、透彻的类群。鱼类肠道黏膜层微生物一般为定殖于鱼类肠道中的土著菌群,这类微生物通常与宿主共同进化,同时在维持宿主肠道健康、调节机体能量吸收、抵抗病原入侵、调控宿主糖脂代谢过程和促进肠道发育方面均发挥重要作用^[6,32,35-36]。

鱼类肠道黏膜层微生物如拟杆菌属(*Bacteroides*)等产生的各种消化酶类可发酵复杂多糖,产生短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs),主要为乙酸、丙酸和丁酸。SCFAs可影响人和哺乳动物机体的血糖调节和能量代谢,其中丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源,在机体高能量代谢过程中发挥重要作用^[37-38]。同时,SCFAs还参与调节肠道上皮细胞生长、免疫系统的分化等多种

重要的生物学过程^[37]。厚壁菌门中的梭杆菌属(*Clostridium*)微生物可定殖于肠皱襞之间,与肠上皮细胞关系紧密,同时有些类群发酵后会产生丁酸,有助于维持肠上皮细胞的健康水平^[39-40]。此外,本课题组前期研究发现,暴露于含铜离子的水体中的鲤(*Cyprinus carpio*),其肠道菌群中产短链脂肪酸微生物如*Allobaculum*、*Blautia*等丰度显著下降,同时肝脏脂肪合成基因表达显著下调,脂肪分解相关基因表达显著升高,提示在面对环境胁迫时肠道菌群对宿主机体脂代谢具调控作用^[41]。在抵抗病原菌入侵方面,鱼类肠道菌群中厚壁菌门中乳杆菌属(*Lactobacillus*)和放线菌门中的双歧杆菌属(*Bifidobacteria*)在水产养殖中的益生作用已被广泛证明^[39-40],益生微生物可通过调节肠道菌群、改善肠道屏障和竞争排斥等方式抵御病原体。相反的,在鱼类肠道菌群失衡时,厚壁菌门中的一些厌氧致病菌,如肠球菌属(*Enterococcus*)和链球菌属(*Streptococcus*)会大量繁殖,引发肠道疾病^[42]。在促进宿主肠道发育方面,人们发现相较于野生型斑马鱼(*Danio rerio*),无菌斑马鱼肠上皮分化受到抑制,如缺少肠道碱性磷酸酶活性,肠上皮细胞缺乏杯状细胞和肠内分泌细胞等,而肠道菌群的重新植入可改善这一现象^[43]。

另一方面,肠上皮细胞黏液通过维持肠道内细菌定殖、形成宿主与上皮细胞之间的空间分隔等保护肠道上皮^[44]。鱼类肠上皮黏液主成分为黏蛋白,此外还含有其他蛋白质、离子和脂类等物质,为微生物的黏附和生长创造了理想的环境。同时,黏液的组成决定了黏液的黏性、弹性、输送能力和保护能力等^[44]。在哺乳动物肠道中可以观察到两层不同的黏液层,外层是“松散的”黏液层,富含微生物群,具有多种寡糖的黏蛋白,内层黏液层基本为无菌状态^[43]。有研究发现,鲤肠道黏液层和哺乳动物较为类似,虽然在鱼类中尚未对上述两种黏液层进行描述,但在大西洋鲑中发现共生菌和病原菌都可以黏附在鱼类肠道黏液中。然而,某些病原体如血清型鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)并不附着在肠道外层黏液中,而是直接附着在黏膜组织上^[44-45]。研究表明,鲤肠道黏液不仅可以促进细菌黏附,还可通过促进细菌趋化来帮助微生物在肠道定殖^[46]。目前,我们对于鱼类宿主黏液层与共生菌和病原菌互作的了解远远不够,有待通过代谢组学、蛋白组学以及共生微生物和宿主肠道互作等研究进一步证实。

2.2 鱼类皮肤黏膜层微生物与宿主的相互作用

鱼类皮肤长期暴露于水环境中,是与外界环境接触面积最大的黏膜层组织,但目前对于鱼类皮肤黏膜层微生物的研究还处于初始阶段^[8,28]。皮肤黏液层是宿主抵御外部不良环境和病原菌过程中重要的物理和化学保护屏障。正常的皮肤黏膜层微生物与宿主形成互利共生关系,皮肤黏液成分可被某些共生微生物代谢,而皮肤黏膜层的多功能性正是由于其共生微生物群落和功能的多样性。

皮肤微生物的群落结构特征可直接影响鱼体健康^[47]。例如,与健康舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)相比,溃疡舌齿鲈皮肤变形菌门的相对丰度明显升高(44.34% vs. 61.22%),疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的相对丰度明显下降(48.36% vs. 25.20%),溃疡舌齿鲈的皮肤微生物群落中有益细菌丰度减少^[47]。此外,感染鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp, SVC)的鲤皮肤黏膜层中,变形菌门的丰度明显升高^[48]。皮肤黏液菌群对鱼体健康的敏感性提示皮肤黏液菌可作为鱼类的微生物标记物,有助于评估养殖鱼类的质量(如健康状况和生长性能)^[28,49]。此外,鱼类皮肤黏液层除为微生物提供附着位点之外,也可影响共生细菌的基因型^[50]。例如,大西洋鲑表面黏液层在允许柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)黏附生长的同时,也改变了其基因的表达^[50]。

2.3 鱼类鳃黏膜层微生物与宿主的相互作用

鳃黏膜层微生物可参与调节黏膜层的免疫状态和防止病原菌入侵。目前,关于鱼类鳃黏膜层微生物群落与宿主互作研究还相对较少。鱼类的鳃是与外界环境相互作用最为密切的黏膜器官之一,也是许多病原体的入口^[51]。已有研究证明,鳃黏膜层微生物在调节鳃免疫状态方面具有重要作用^[52]。例如,弯杆菌属(*Flectobacillus*)作为虹鳟皮肤和鳃上的优势属,可调节鳃部IgT表达和分泌,调控B淋巴细胞的数量并影响其他共生细菌的增长^[52]。有研究表明,鳃黏膜层共生微生物的存在可能更有利于鳃的气体交换^[53-54]。例如,关于鲤和斑马鱼的研究发现,鳃黏膜层中含有氨氧化和反硝化细菌(如*Nitrosomas*-like细菌),这类功能微生物被认为在鱼类的氨解毒作用中起着重要作用^[53-54]。另一项研究表明虹鳟鳃黏膜层分泌的免疫球蛋白(如IgT、IgM)不仅可以清除病原菌,还可促进鳃黏膜层共生微生物(隶属于拟杆菌门和变形菌门)的定殖^[55]。因此,有关鳃黏膜层微

生物在调节宿主健康、气体交换和防止病原菌入侵方面的作用还有待发掘。

3 鱼类黏膜层微生物影响因素

对鱼类黏膜层微生物的研究普遍表明,宿主特性、饮食和环境特征被认为是影响鱼类黏膜层共生微生物群落结构的主要驱动因素。

3.1 宿主因素

宿主的遗传背景(如宿主的食性、发育阶段、性别等)被认为是影响鱼类黏膜层微生物种内和种间差异的重要因素。不同食性鱼类肠道菌群结构明显不同,肉食性鱼类的肠道菌群多样性普遍较低,杂食性和草食性鱼类肠道菌群多样性逐渐增加,肠道菌群的优势类群也有所不同^[56]。例如,在肉食性鱼类中,鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和盐单胞菌属(*Halomonas*)丰度较高;在杂食性鱼类中,鲸杆菌属和盐单胞菌属丰度较高;在草食性鱼类中,梭杆菌属、柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)和纤毛菌属(*Leptotrichia*)的丰度较高。目前,虽然还没有关于不同食性鱼类皮肤、鳃黏膜层微生物群落差异的系统研究,但有研究显示,肉食性鱼类虹鳟皮肤微生物的 α -多样性最高,其次是鳃和肠道^[15];而植食性为主的杂食性鱼类褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)后肠微生物的 α -多样性最高,鳃和皮肤次之^[10];杂食性鱼类鲤鳃(25个门,173个属)中鉴定出的微生物分类单元反而高于皮肤(22个门,156个属)和肠道(24个门,150个属)^[48]。因此,有关鱼类食性对皮肤和鳃黏膜层微生物的影响还有待深入探究。

此外,鱼类在不同发育阶段肠道菌群存在较大差异,这种差异归因于遗传背景下的宿主不同发育阶段的转食特性、生活环境等多重因素。例如,斑马鱼幼鱼的肠道微生物群中细菌的相对丰度高于成鱼^[57]。在大西洋鲑和大口鲈(*Silurus meridionalis*)的不同发育阶段,肠道菌群结构均体现出明显差异^[58-59]。此外,舌齿鲈幼鱼和成鱼的皮肤和鳃微生物 α -多样性显著高于稚鱼,而金头鲷(*Sparus aurata*)幼鱼期和成鱼期,皮肤和鳃微生物 α -多样性无显著差异^[60]。不同鱼类鳃黏膜层微生物存在一定差异,如有研究通过16S rRNA变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)发现异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)鳃黏膜层微生物组成具有差异^[61]。有关鱼类性别对

鱼类黏膜层微生物群落结构的影响尚存在争议。例如, 有研究发现不同性别三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 和河鲈 (*Perca fluviatilis*) 肠道菌群存在差异^[62], 但也有研究发现不同性别斑马鱼肠道菌群是相似的^[57], 这归因于宿主差异、饮食和环境差异等多种综合因素。

虽然鱼类皮肤长期暴露在水环境中, 但皮肤黏膜层共生微生物的群落组成受宿主因素影响较大, 且明显不同于周围的水体微生物。例如, 有关 44 种珊瑚礁鱼类的研究表明, 皮肤微生物具有宿主特异性, 且皮肤微生物多样性高于水体微生物^[63]。然而有关宿主的性别、发育阶段等因素对鱼类皮肤和鳃黏膜层微生物群落特征的影响还有待探究。

3.2 饮食因素

摒除宿主遗传因素的影响, 同一种鱼类黏膜层微生物群落结构也会受到饲料组分、益生菌、益生元等各种饮食因素的影响^[64], 这种饮食因素在一段时间内可重塑宿主黏膜层微生物, 但一般不影响核心种群或优势种群的结构特征。如虹鳟摄食后的短时间 (3 h) 内不足以引起肠道菌群组成的显著变化, 但可以引起某些物种的多样性和相对丰度的变化^[65]。同样的, 大口鲶在摄食后的 3、12 和 24 h, 肠道菌群的 α -多样性并没有发生变化, 但优势门的相对丰度有所不同, 这也暗示短期进食会影响优势物种丰度的变化, 但对微生物的多样性影响较小^[59]。

有关鱼类膳食或水体添加益生菌对维持和改善鱼体肠道健康一直是研究的热点^[64]。然而, 膳食或水体中添加益生菌不仅可以使肠道中具有黏附活性的益生菌占优势, 还可显著增加皮肤黏膜层中蛋白质的含量^[13]。也有研究表明, 添加益生菌可调节皮肤和鳃黏膜层微生物的群落结构^[66]。由此看来, 饮食因素或饮食中添加益生菌、益生元等既会影响鱼类肠道菌群, 也可影响皮肤、鳃等黏膜层微生物的构成。

3.3 环境因素

大部分鱼类终身生活在水环境中, 各种水环境因子 (如水体温度、pH、盐度等) 直接或间接影响鱼类黏膜屏障及其共生微生物群落结构^[67]。虽然鱼类胚胎是在一个相对稳定的无菌环境中 (在卵内或母体内) 发育, 但受精卵孵化后, 鱼体的皮肤、鳃和肠道会受到不断变化的环境因素的影响, 这

些因素在其整个生命周期中极大地影响黏膜层共生微生物的群落结构。在众多环境因子中, 盐度被证实是影响鱼类肠道菌群、鳃和皮肤共生微生物的主要环境因子。有研究发现, 淡水和海水鱼类肠道菌群存在显著差异^[32]。此外, 生活在不同的盐度环境中的广盐性鱼类, 肠道菌群也有所差异。例如, 尼罗罗非鱼在低盐或高盐胁迫下, 肠道中条件致病菌如不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 的比例增加, 有益微生物群落数量减少^[22]。此外, 盐度也可显著影响鱼类皮肤黏膜层微生物, 变形菌门是海水和淡水大西洋鲑皮肤中的共有优势类群, 随着盐度的增加 (从淡水到海水) 拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门、蓝细菌门和疣微菌门的丰度逐渐减少^[68]。然而, 相比于肠道内环境, 鱼类的皮肤和鳃直接与水环境相接触, 皮肤和鳃黏膜层微生物更易受到各种环境因素的影响^[15]。因此, 相比于肠道环境, 皮肤和鳃黏膜层微生物与水体微生物的相似性更高。

此外, 鱼体健康状态、季节变化、饲养模式等因素均会引起鱼类黏膜层微生物的变化^[16, 28]。有研究表明, 与健康个体相比, 其鳃黏膜层嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 的丰度较低, 而潜在的致病菌黄杆菌属和黏着杆菌属 (*Tenacibaculum*) 的丰度较高^[69]。养殖大西洋鲑的肠道微生物对水温的季节性变化反应较为敏感, 弧菌科 (*Vibrionaceae*) 在较高温度下为优势菌群 (14~18 °C), 相对应的, 在较低温度时 (10~12 °C), 弧菌科的丰度低于检测限, 厚壁菌门中的一些乳酸菌成为肠道中的优势菌群^[70]。

4 鱼类黏膜层微生物研究策略和应用价值

大量证据表明, 鱼类黏膜层共生微生物在宿主的健康方面发挥着关键作用。在水产养殖中, 密集、集约化的养殖方式增加了鱼体生态失调 (即微生物失衡) 和病原感染的风险, 从而给水产养殖带来不可估量的损失, 如何寻找切实有效的方法提升鱼类健康水平对水产养殖业的可持续发展至关重要^[24]。对鱼类黏膜层微生物群落结构、与宿主互作机制及其影响因素的探究, 将为人为操控鱼类黏膜层微生物、调控鱼体健康提供新的见解, 也可为野生环境中评估鱼类健康水平提供新的思路。

4.1 鱼类黏膜层微生物研究策略

鱼类黏膜层微生物群落和功能的研究主要依

赖于免培养和纯培养技术(图2)。目前, 16S *rRNA* 高通量测序(Illumina MiSeq/HiSeq等)已成为评估微生物群落结构最基础、最常用的技术手段^[71], 此外, 宏基因组(Metagenomics)、纳米孔(Nanopore)等新兴测序方法成本的逐步降低, 蛋白组学和代谢组学技术的迅速推广等也将进一步推动人们对鱼类黏膜层微生物群落结构和功能的了解(图2)。

研究表明, 纯培养技术往往只能检测到微生物群落的有限部分。然而, 基于微生物生态学的原理, 微生物群落中的分类单元间存在复杂的交叉喂养关系(即一种微生物的代谢产物很可能是与其共生微生物的代谢底物)。因此, 黏膜层微生物群落结构、代谢产物、各分类单元间的分子生态网络关系、黏膜层组成成分等都将为纯菌株的培养和益生菌的筛选提供参考(图2)。

4.2 鱼类黏膜层微生物研究在水产行业的应用价值

皮肤、鳃和肠道是鱼类中研究最多的3种黏膜层组织。然而, 有关鱼类共生菌的分离及其益生菌对黏膜组织影响的研究主要集中在肠道, 较少有研究关注鱼类皮肤和鳃黏膜层共生益生菌,

而皮肤和鳃也将是挖掘鱼源益生菌的重要来源。同时, 鱼类鳃、肠道和皮肤黏膜层微生物优势种的差异, 提示在养殖中采用复合益生菌提升鱼体健康水平和环境适应能力似乎更为可行^[25]。在养殖环境中, 对鱼类黏膜层微生物益生菌的筛选、开发和应用, 既可为未来操控鱼类黏膜层微生态平衡和调控鱼类健康提供重要思路, 也可促进养殖业的绿色可持续发展^[9-11]。

此外, 在野生环境中, 可变的皮肤和鳃黏膜层微生物以及它们对环境因子响应的敏感性, 表明鱼类皮肤和鳃黏膜层微生物是开发野生环境(如重要的种质资源保护区、水库等)鱼类健康水平或环境健康状态微生物标志物的重要目标^[72]。由此可见, 皮肤和鳃黏膜层微生物对多种病原感染和环境压力的敏感性, 可使其作为快速诊断野生环境和养殖鱼类疾病的指标, 从而指导我们对水生环境评估和野生鱼类的保护工作。

5 展望

鱼类黏膜层微生物与鱼类健康存在着错综复杂的联系。近年来, 虽然人们对鱼类肠道菌群的研究取得长足的进展, 然而人们对鱼类黏膜层微

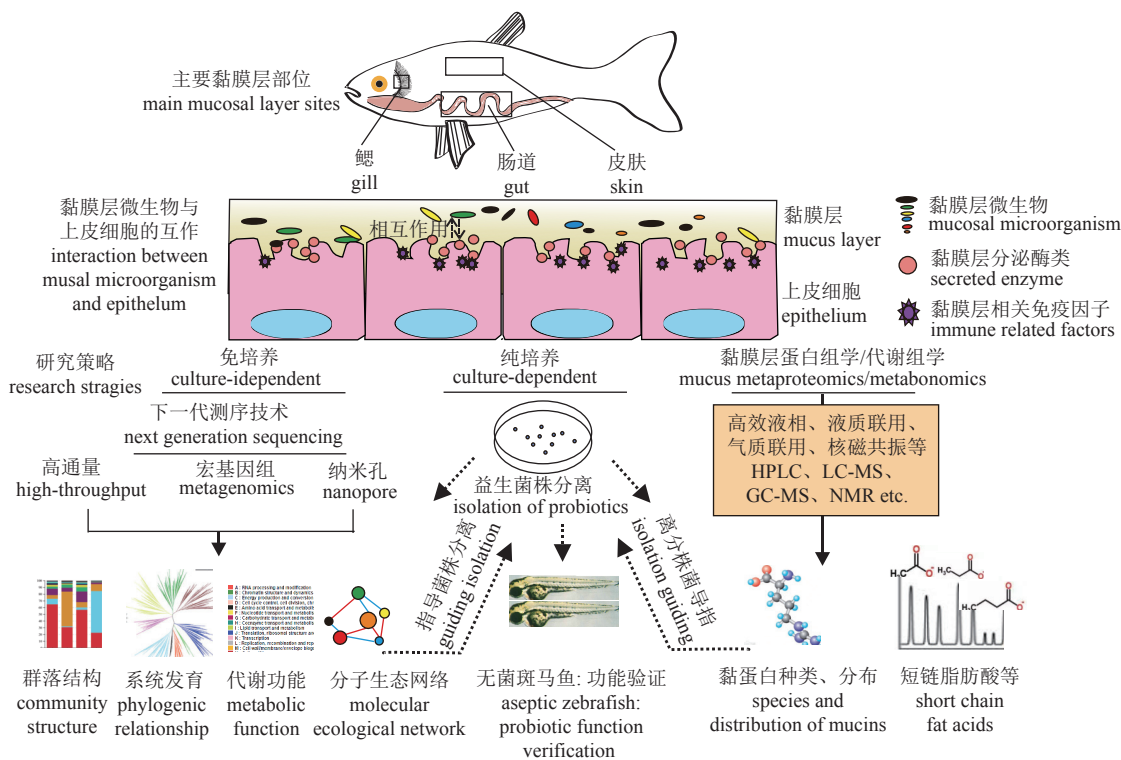


图2 鱼类黏膜层微生物的分布部位、与上皮细胞的相互作用及研究策略

Fig. 2 Distribution, interactions with epithelial cells and research strategies of fish mucosal microorganisms

生物(尤其是皮肤和鳃)群落结构的决定因素、各微生物分类单元间的生态网络关系及其与宿主互作原理的系统理解仍然缺乏。

从理论研究方面来看,未来针对鱼类黏膜层微生物功能及其与宿主相互作用的研究需要宏基因组学、蛋白组学、代谢组学和优化的纯培养技术(如基于微生物分类单元交叉互养关系的纯培养手段)等方法、技术的有机结合。同时,我们对于鱼类宿主如何调节黏液蛋白基因表达、黏液糖基化模式和黏液组成以及对共生菌和病原菌黏附作用了解还远远不够,微生物定殖皮肤、鳃和肠道黏膜层的关键基因,如附着或黏液蛋白降解的基因,需要被进一步的探索^[73]。

在水产益生菌筛选方面,除肠道外,鱼类其他部位黏膜层共生微生物均可作为鱼源益生菌挖掘的重要来源。已有研究发现皮肤和鳃黏膜层的免疫状态也可通过饲料或水体添加益生菌来调节^[66,74],因此,益生菌对鱼类黏膜层表面的作用不应仅仅局限于肠道,还应广泛探索其对皮肤和鳃的影响,鱼类黏膜层微生物中益生菌的开发和利用也将为未来综合管理和调控鱼类健康提供新的思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Rajeev R, Adithya K K, Kiran G S, *et al.* Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1): 238-258.
- [2] Gallo B D, Farrell J M, Leydet B F. Fish gut microbiome: a primer to an emerging discipline in the fisheries sciences[J]. *Fisheries*, 2020, 45(5): 271-282.
- [3] 孟晓林, 聂国兴. 鱼类肠道菌群与机体脂质代谢关系研究进展[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(6): 1221-1229.
Meng X L, Nie G X. Advances of intestinal microbiota and lipid metabolism of fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1221-1229 (in Chinese).
- [4] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 143-155.
Meng X L, Li W J, Nie G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota[J]. *Journal of fisheries of China*, 2019, 43(1): 143-155 (in Chinese).
- [5] 鲁程瑶, 丁倩雯, 冉超, 等. 鱼类消化道菌群与碳水化合物代谢[J]. *水产学报*, 2019, 43(10): 2074-2083.
Lu C Y, Ding Q W, Ran C, *et al.* Gut microbiota and carbohydrate metabolism in fish[J]. *Journal of fisheries of China*, 2019, 43(10): 2074-2083 (in Chinese).
- [6] Talwar C, Nagar S, Lal R, *et al.* Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(4): 397-414.
- [7] Grice E A, Segre J A. The skin microbiome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(4): 244-253.
- [8] Ross A A, Hoffmann A R, Neufeld J D. The skin microbiome of vertebrates[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 79.
- [9] Guivier E, Pech N, Chappaz R, *et al.* Microbiota associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachanna toxostoma* from the Rhône basin[J]. *Freshwater Biology*, 2020, 65(3): 446-459.
- [10] Wu Y J, Xiao F S, Wang C, *et al.* The beta-diversity of *Siganus fuscescens*-associated microbial communities from different habitats increases with body weight[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1562.
- [11] De Bruijn I, Liu Y Y, Wiegertjes G F, *et al.* Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(1): fix161.
- [12] Falkow S. Is persistent bacterial infection good for your health?[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 699-702.
- [13] Lazado C C, Caipang C M A. Mucosal immunity and probiotics in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(1): 78-89.
- [14] Dickerson H W. "The biology of teleost mucosal immunity." *Fish defenses: pathogens, parasites and predators* [M] Science Publishers. 2009: 1-42.
- [15] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6915-6925.
- [16] Llewellyn M S, Boutin S, Hoseinifar S H, *et al.* Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 207.
- [17] Merrifield D L, Rodiles A. 10-The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues[M]//Beck B H, Peatman E. *Mucosal Health in Aquaculture*. San Diego: China Water & Fisheries Society, 2019: 1-15.
<https://www.china-fishery.cn>

- Academic Press, 2015: 273-295.
- [18] Hamilton E F, Element G, De Groot P V C, *et al.* Anadromous *Arctic Char* microbiomes: bioprospecting in the high Arctic[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 22.
- [19] Dulski T, Kujawa R, Godziewa M, *et al.* Effect of salinity on the gut microbiome of Pike fry (*Esox lucius*)[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(7): 2506.
- [20] Lisboa V, Barcarolli I F, Sampaio L A, *et al.* Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae)[J]. *Neotropical Ichthyology*, 2015, 13(2): 447-452.
- [21] Schmidt V T, Smith K F, Melvin D W, *et al.* Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(10): 2537-2550.
- [22] Zhang M L, Sun Y H, Liu Y K, *et al.* Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 72-80.
- [23] Zhao R X, Symonds J E, Walker S P, *et al.* Salinity and fish age affect the gut microbiota of farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735539.
- [24] Rosado D, Pérez-Losada M, Severino R, *et al.* Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 57-64.
- [25] 刘玉春, 周志刚, 石鹏君, 等. 网箱养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群的PCR-DGGE比较分析[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(1): 81-86.
- Liu Y C, Zhou Z G, Shi P J, *et al.* The comparative analysis of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara* in cages by PCR-DGGE[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(1): 81-86 (in Chinese).
- [26] Yukgehnai K, Kumar P, Sivachandran P, *et al.* Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(3): 1903-1927.
- [27] Zhang C H, Derrien M, Levenez F, *et al.* Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2235-2245.
- [28] Gomez J A, Primm T P. A slimy business: the future of fish skin microbiome studies[J]. *Microbial Ecology*, 2021, doi: 10.1007/s00248-020-01648-w.
- [29] Pedrós-Alió C. The rare bacterial biosphere[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2012, 4: 449-466.
- [30] Zhang Y M, Wu G, Jiang H C, *et al.* Abundant and rare microbial biospheres respond differently to environmental and spatial factors in tibetan hot springs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2096.
- [31] Skopina M Y, Vasileva A A, Pershina E V, *et al.* Diversity at low abundance: the phenomenon of the rare bacterial biosphere[J]. *Microbiology*, 2016, 85(3): 272-282.
- [32] Gómez G D, Balcázar J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 52(2): 145-154.
- [33] Zhang M L, Li M, Sheng Y, *et al.* *Citrobacter* species increase energy harvest by modulating intestinal microbiota in fish: nondominant species play important functions[J]. *Msystems*, 2020, 5(3): e00303-20.
- [34] Kim S, Covington A, Pamer E G. The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens[J]. *Immunological Reviews*, 2017, 279(1): 90-105.
- [35] Flint H J, Duncan S H, Scott K P, *et al.* Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2015, 74(1): 13-22.
- [36] Brugman S, Ikeda-Ohtsubo W, Braber S, *et al.* A comparative review on microbiota manipulation: lessons from fish, plants, livestock, and human research[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5: 80.
- [37] Smith P M, Howitt M R, Panikov N, *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T_{reg} cell homeostasis[J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [38] Hamer H M, Jonkers D, Venema K, *et al.* Review article: the role of butyrate on colonic function[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 27(2): 104-119.
- [39] Ringo E, Hoseinifar S H, Ghosh K, *et al.* Lactic acid bacteria in finfish—an update[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1818.

- [40] Wang A R, Ran C, Wang Y B, *et al.* Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 734-755.
- [41] Meng X L, Li S, Qin C B, *et al.* Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 160: 257-264.
- [42] Li T T, Li H, Gatesoupe F J, *et al.* Bacterial signatures of "red-operculum" disease in the gut of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(3): 510-521.
- [43] Johansson M E V, Ambort D, Pelaseyed T, *et al.* Composition and functional role of the mucus layers in the intestine[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(22): 3635-3641.
- [44] Gomez D, Sunyer J O, Salinas I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1729-1739.
- [45] Neuhaus H, Van Der Marel M, Caspari N, *et al.* Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins[J]. *Journal of Fish Biology*, 2007, 70(5): 1523-1534.
- [46] Van Der Marel M, Schroers V, Neuhaus H, *et al.* Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(5): 321-330.
- [47] Cámara-Ruiz M, Cerezo I M, Guardiola F A, *et al.* Alteration of the immune response and the microbiota of the skin during a natural infection by *Vibrio harveyi* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 964.
- [48] Meng K F, Ding L G, Wu S, *et al.* Interactions between commensal microbiota and mucosal immunity in teleost fish during viral infection with SVCV[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 654758.
- [49] Tapia-Paniagua S T, Ceballos-Francisco D, Balebona M C, *et al.* Mucus glycosylation, immunity and bacterial microbiota associated to the skin of experimentally ulcerated gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 381-390.
- [50] Staroscik A M, Nelson D R. The influence of salmon surface mucus on the growth of *Flavobacterium columnare*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(1): 59-69.
- [51] Schloss P D. An integrated view of the skin microbiome[J]. *Nature*, 2014, 514(7520): 44-45.
- [52] Sepahi A, Cordero H, Goldfine H, *et al.* Symbiont-derived sphingolipids modulate mucosal homeostasis and B cells in teleost fish[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39054.
- [53] Van Kessel M A H J, Mesman R J, Arshad A, *et al.* Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(5): 590-594.
- [54] Austin B. The bacterial microflora of fish, revised[J]. *The Scientific World Journal*, 2006, 6: 325830.
- [55] Xu Z, Takizawa F, Casadei E, *et al.* Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution[J]. *Science Immunology*, 2020, 5(44): eaay3254.
- [56] Li X M, Yu Y H, Feng W S, *et al.* Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae[J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(1): 29-37.
- [57] Stephens W Z, Burns A R, Stagaman K, *et al.* The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 644-654.
- [58] Lokesh J, Kiron V, Sipkema D, *et al.* Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals stage-specific microbial signatures[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(4): e00672.
- [59] Zhang Z M, Li D P, Refaey M M, *et al.* Host age affects the development of southern catfish gut bacterial community divergent from that in the food and rearing water[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 495.
- [60] Rosado D, Pérez-Losada M, Pereira A, *et al.* Effects of aging on the skin and gill microbiota of farmed seabass and seabream[J]. *Animal Microbiome*, 2021, 3(1): 10.
- [61] Wang W W, Zhou Z G, He S X, *et al.* Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of poly-cultured gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and blunt-nose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih)[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): e72-e83.

- [62] Bolnick D I, Snowberg L K, Hirsch P E, *et al.* Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4500.
- [63] Chiarello M, Auguet J C, Bettarel Y, *et al.* Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet[J]. *Microbiome*, 2018, 6: 147.
- [64] 张美玲, 单承杰, 杜震宇. 益生菌与鱼类肠道健康研究进展[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 147-157.
Zhang M L, Shan C J, Du Z Y. Research advances on probiotics and fish gut health[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 147-157 (in Chinese).
- [65] Mente E, Nikouli E, Antonopoulou E, *et al.* Core versus diet-associated and postprandial bacterial communities of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) midgut and faeces[J]. *Biology Open*, 2018, 7(6): bio034397.
- [66] Wang M, Yi M M, Lu M X, *et al.* Effects of probiotics *Bacillus cereus* NY5 and *Alcaligenes faecalis* Y311 used as water additives on the microbiota and immune enzyme activities in three mucosal tissues in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in outdoor tanks[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100309.
- [67] Salinas I, Magadán S. Omics in fish mucosal immunity[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 75: 99-108.
- [68] Lokesh J, Kiron V. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19707.
- [69] Steinum T, Sjøstad K, Falk K, *et al.* An RT-PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 172-179.
- [70] Neuman C, Hatje E, Zarkasi K Z, *et al.* The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(2): 660-672.
- [71] Ghanbari M, Kneifel W, Domig K J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 464-475.
- [72] Sylvain F É, Holland A, Bouslama S, *et al.* Fish skin and gut microbiomes show contrasting signatures of host species and habitat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): 00789-20.
- [73] Minniti G, Sandve S R, Padra J T, *et al.* The farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin-mucus proteome and its nutrient potential for the resident bacterial community[J]. *Genes*, 2019, 10(7): 515.
- [74] Sadeghi F, Ahmadifar E, Moghadam M S, *et al.* Lemon, *Citrus aurantifolia*, peel and *Bacillus licheniformis* protected common carp, *Cyprinus carpio*, from *Aeromonas hydrophila* infection by improving the humoral and skin mucosal immunity, and antioxidative responses[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2021, 52(1): 124-137.

Research progress of mucosal microorganisms of fish

ZHANG Yanmin^{1,2,3}, YANG Guokun^{1,2,3}, LI Keke³, MENG Xiaolin^{1,2,3*}

(1. *College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;*

2. *Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;*

3. *HeNan JinBaiHe Biotechnology Co., LTD., Xinxiang 453007, China)*

Abstract: Fish mucosa (mainly skin, gill, intestine, etc.) and their symbiotic microorganism play a key role in regulating the homeostasis of the fish mucosal microenvironment and promoting fish health. In the past 10 years, fish intestinal mucosal microbes have attracted much attention because of their important role regulating fish nutrition and health. However, research on symbiotic microbes in other mucosal organs of fish (such as skin and gill) has been relatively delayed. In order to better understand the relationship between fish mucosal microbes, mucosal microenvironment homeostasis and their effects on fish health, this article will review the research progress and the existing problems of fish mucosal microorganism, in terms of the community structure, influencing factors, research strategies and application value of fish mucosal microbes based on the literature published in recent years. It aims to provide new ideas and strategies for the effective regulation of mucosal microorganisms of fish and their applications in production and practice.

Key words: fish; mucosal microorganisms; community structure; influencing factors; research strategy; application value

Corresponding author: MENG Xiaolin. E-mail: mengxiaolinqdio@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U1904118); Science and Technology Breakthrough Major Project in Henan Province (202102110259); Natural Science Foundation of Henan Province (212300410174)