

文章编号: 1000-0615(2017)07-1148-10

DOI: 10.11964/jfc.20160610460

尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌结构特征及其与 鱼体健康状况相关关系

王 淼, 卢迈新*, 衣萌萌, 曹建萌, 高风英

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 黏膜及其表面的共生菌群是鱼类抵御外界不利环境的第一道屏障。为探索养殖罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌菌群的结构特征是否与其健康状况间存在相关关系, 本研究运用高通量测序技术, 以无乳链球菌腹腔注射攻毒48 h后存活和濒死尼罗罗非鱼为检测对象, 检测攻毒前后罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌群落结构差异。结果显示, 健康尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌均存在优势菌群, 主要为特吕珀菌属、硫杆菌属、弓形杆菌属、海单胞菌属和弧菌属。人工感染无乳链球菌后存活尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌菌群与感染前无显著差异; 与存活组相比, 濒死尼罗罗非鱼的表皮和鳃黏膜共生菌菌群多样性下降, 其中弓形杆菌属、假交替单胞菌属、海单胞菌属、假单胞菌属和弧菌属等含量显著下降, 链球菌属含量占总菌群的55.30%±1.24%, 表明养殖尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌群落结构可能与其健康状况相关。

关键词: 尼罗罗非鱼; 皮肤; 鳃; 共生菌; 高通量测序技术

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

鱼类黏膜暴露于水体环境中, 与水环境直接接触, 也是各种微生物进入鱼体的重要通道。研究发现, 黏膜上的共生菌群在鱼类适应生存环境中起到重要作用, 且与黏膜的免疫作用紧密相关^[1]。当鱼体处于健康状态时, 其体内外的微生物菌群维持相对稳定的动态平衡状态, 而当这种平衡被打破时, 菌群群落结构的失衡可以显著影响宿主的生理和免疫状态^[2-3]。肠道菌群结构研究发现, 染病的半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)肠道中的细菌群落结构多样性显著低于健康鱼^[4]。Austin^[5]发现健康和濒死大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的体表细菌组成有很大差异, 比如狭小发光杆菌(*Photobacterium angustum*)、火神发光杆菌(*P. bgei*)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)

和坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)仅存在于健康鱼的体表。因此, 鱼类黏膜的共生菌与鱼体健康状况间可能存在一定的相关性, 二者间的关系值得进一步研究。

我国是全球最大的罗非鱼生产国, 产量占世界总产量的40%^[6]。然而, 由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)引起的链球菌病给罗非鱼养殖业带来了严重危害, 发病率日趋上升, 部分地区高达100%^[7]。使用抗生素类药物是目前最有效的防治罗非鱼链球菌病手段, 但过量抗生素药物的应用给罗非鱼养殖带来了日益突显的负面作用, 如致病菌的耐药性、水产品药物残留等问题^[8]。由于缺乏罗非鱼健康状况的评价技术, 依靠经验的管理模式存在一定的盲目性和风险性, 不能及时发现养殖罗非鱼已经处于亚

收稿日期: 2016-06-27 修回日期: 2016-11-09

资助项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015A02XK02; 2016HY-ZD1403); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201401B04); 现代农业产业技术体系专项(CARS-49)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

健康状态,造成群体生长速率下降,且容易发生疾病或死亡。同预测病害发生的原理相似,鱼类在从健康状态向亚健康状态转变的过程中,鱼体的某些指标随之改变,这些指标可以被用来评判鱼体的健康状况。因此,科学有效地评价罗非鱼健康状况,减少化学药物的使用,对罗非鱼养殖业的可持续发展具有促进作用。

本研究运用高通量测序技术(Illumina MiSeq)比较分析健康罗非鱼、无乳链球菌攻毒后存活和濒死罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌群落结构的差异,初步探索罗非鱼表皮和鳃共生菌群落结构与鱼体健康状况之间的关系,为建立罗非鱼健康指标体系提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验设计和样品采集

实验鱼为经检测未感染无乳链球菌的吉富品系健康尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GIFT strain),由中国水产科学研究院珠江水产研究所高要良种基地提供,平均体质量为 (100 ± 10) g,体长 (13.2 ± 1.8) cm。取罗非鱼120尾,随机分配至6个方形塑料箱,3箱实验组,3箱对照组,20尾/箱,每个塑料箱(长 $\times$ 宽 $\times$ 高 $=0.89\text{ m}\times 0.67\text{ m}\times 0.50\text{ m}$)实际水体积为300 L,自来水暴晒7 d后暂养7 d,无死亡及其他异常后进行后续无乳链球菌攻毒实验。罗非鱼源无乳链球菌强毒株(编号:WC1535),分离于海南文昌潭牛镇患病尼罗罗非鱼,由国家罗非鱼产业技术体系养殖与病害研究室分离、鉴定并保存。实验组以经预实验确定的无乳链球菌半致死浓度 $LD_{50}(4.0\times 10^5\text{ CFU/尾})^{[9]}$,采用腹腔注射法攻毒;对照组每尾注射0.01 mol/L的PBS 200 μL ,观察、记录罗非鱼死亡情况。

取攻毒前罗非鱼(健康罗非鱼)9尾(实验组4尾,对照组5尾),编号为I;在攻毒后0~48 h,观察罗非鱼死亡情况,随时将濒死个体捞出,共取9尾,编号为D(预实验表明,无乳链球菌攻毒48 h后罗非鱼死亡率达到较高水平);攻毒48 h后,取PBS组罗非鱼9尾,编号为P;取无乳链球菌攻毒组存活个体9尾,编号为L。

用无菌生理盐水冲洗罗非鱼体表2遍,以除去体表污物,用无菌刀片取罗非鱼躯干部皮肤2 g(未去除鳞片),分装至1.5 mL离心管中。用无菌生理盐水冲洗罗非鱼鳃部2遍,以除去污物,剪

下鱼鳃,去除鳃弓,将鳃丝置于1.5 mL离心管中。皮肤和鳃样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于共生菌群落结构分析。将I、P、L和D组每组的9尾罗非鱼样品,每3尾混合成一个待测样品,每组共3个皮肤样品(S),3个鳃样品(G)。皮肤样品标记为I1S, I2S, I3S; P1S, P2S, P3S; L1S, L2S, L3S; D1S, D2S, D3S。鳃样品标记为I1G, I2G, I3G; P1G, P2G, P3G; L1G, L2G, L3G; D1G, D2G, D3G。

1.2 细菌总DNA的提取

使用环境样本DNA纯化试剂盒(ZYMO Research公司)提取样品的总基因组DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测所提总DNA的完整性。

1.3 高通量测序分析

按指定测序区域,合成带有Barcode的特异引物对样本的16S *rDNA* V4区域进行扩增。每个样本进行3个重复,每个PCR反应终止于线性扩增期,PCR结束后将同一样本的PCR产物混合后用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,使用QIAquick凝胶回收试剂盒(QIAGEN公司)切胶回收PCR产物,TE缓冲液洗脱回收目标DNA片段;使用2%琼脂糖电泳检测,检测条件5 V/cm, 20 min。

参照电泳初步定量结果,将PCR回收产物用GE NanoVue系统(GE Healthcare公司)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。文库构建使用Illumina公司TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit (FC-121-3001/3002)。测序使用Illumina公司MiSeq Reagent Kit v3 (MS-102-3003)。

1.4 数据分析

MiSeq测序得到的PE reads首先使用FLASH^[10]进行拼接,同时对序列质量进行质控,在去除低质量碱基及接头污染序列等操作过程后完成数据过滤,得到可供后续分析的高质量目标序列。后续生物信息学操作使用Usearch、QIIME^[11]或Mothur^[12]完成,统计和作图使用R软件^[13]完成。

用SigmaPlot for Windows (v. 11.0, Systat Software, Inc., Germany)统计软件进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA),比较罗非鱼皮肤和鳃样品不同处理组间菌群门及属的差异。数据采用 $\text{mean}\pm\text{SE}$ 表示。

2 结果

2.1 健康尼罗罗非鱼黏膜共生菌群落组成

健康尼罗罗非鱼(攻毒前样品)皮肤共生菌主要类群:变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、异常球菌—栖热菌门(Deinococcus-Thermus)和放线菌门(Actinobacteria),平均相对丰度分别为65.2%、6.2%、5.9%、5.9%和4.3%,合计占总细菌序列数的87.4%(图1)。鳃丝共生菌主要类群:变形菌门、异常球菌—栖热菌门、厚壁菌门和梭杆菌

门(Fusobacteria),平均相对丰度分别为74.1%、9.9%、5.3%和2.8%,合计占总细菌序列数的92.1%(图1)。对比发现,健康皮肤共生菌类群中的绿弯菌门、厚壁菌门、放线菌门、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和酸杆菌门(Acidobacteria)的相对丰度高于鳃样品,其中绿弯菌门、放线菌门、芽单胞菌门和酸杆菌门差异显著($P<0.05$),而异常球菌—栖热菌门、变形菌门和梭杆菌门相对丰度则低于鳃样品,其中变形菌门和梭杆菌门差异显著($P<0.05$)(图2)。

将共生菌进一步细分到属,发现健康尼罗

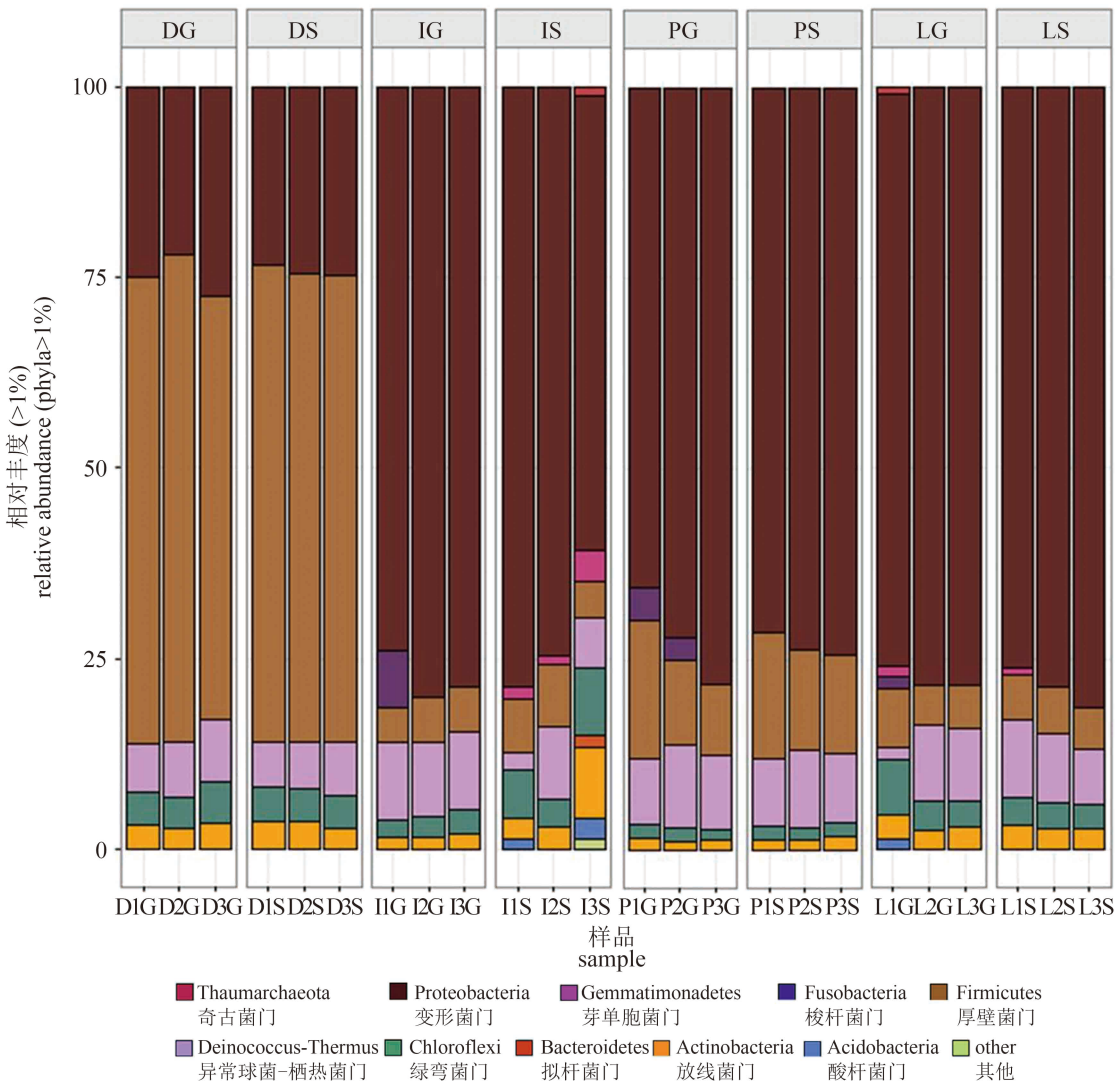


图1 尼罗罗非鱼皮肤和鳃各样品中的主要细菌门类的相对丰度

分析中将总丰度过低(<1%)的门去除。G: 鱼鳃样品; S: 鱼皮肤样品。D: 感染无乳链球菌后的濒死尼罗罗非鱼; L: 感染无乳链球菌后的存活尼罗罗非鱼; I: 感染无乳链球菌前的健康尼罗罗非鱼; P: 注射PBS后的尼罗罗非鱼, 下同

Fig. 1 Relative abundances of the dominant bacteria in *O. niloticus* skin and gill samples at phylum level

G: gill; S: skin. D: dying *O. niloticus* after *S. agalactiae* injection; L: live *O. niloticus* after *S. agalactiae* injection; I: health *O. niloticus* before injection; P: *O. niloticus* after PBS injection, the same below

罗非鱼皮肤和鳃的主要共生菌基本相同, 主要是特吕珀菌属(*Truepera*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、

弓形杆菌属(*Arcobacter*)、海单胞菌属(*Marinomonas*)和弧菌属(*Vibrio*), 二者无显著差异, 在皮

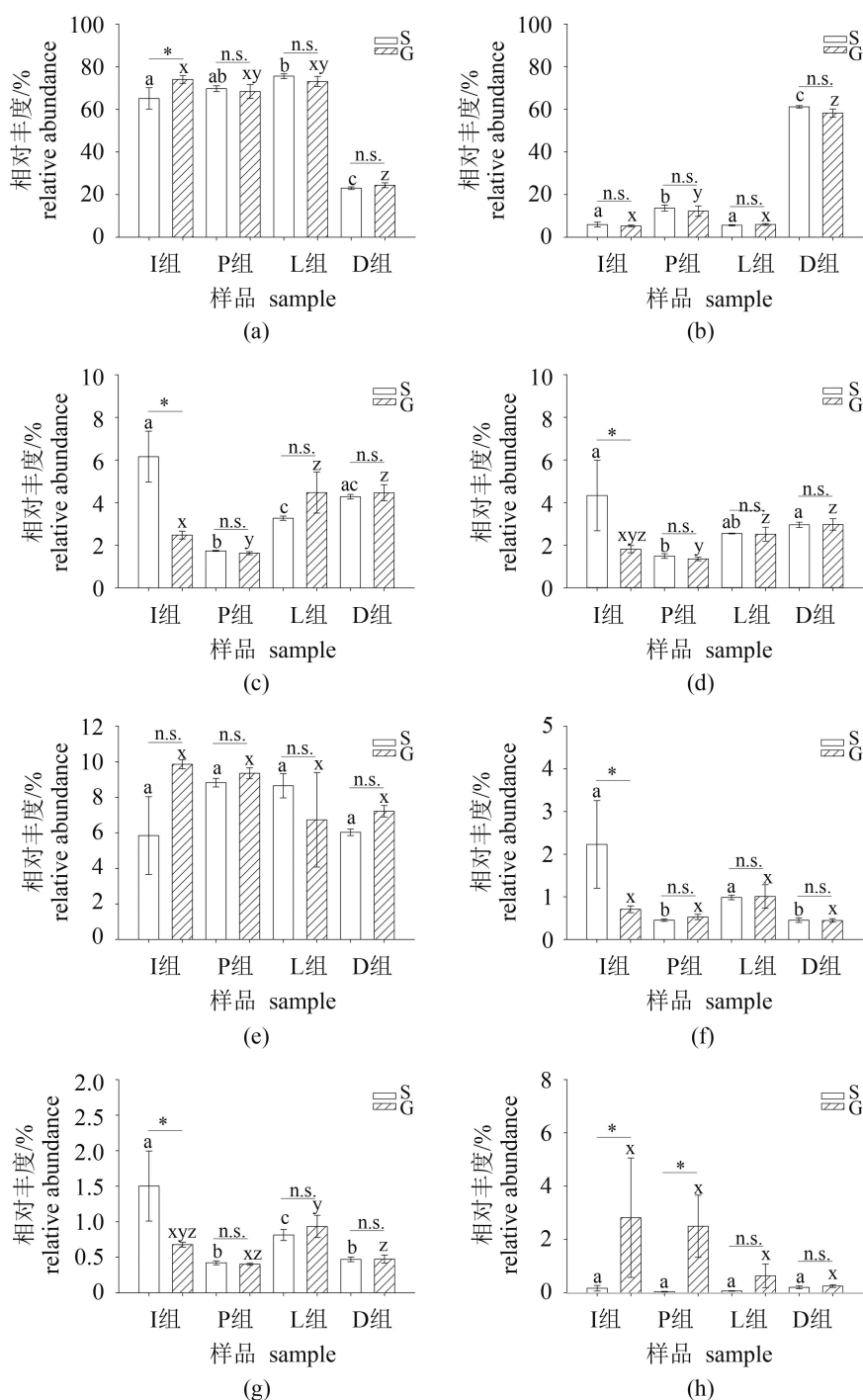


图 2 不同样品主要细菌门相对丰度

(a)变形菌门; (b)厚壁菌门; (c)绿弯菌门; (d)放线菌门; (e)异常球菌—栖热菌门; (f)芽单胞菌门; (g)酸杆菌门; (h)梭杆菌门。*同一处理组的皮肤和鳃样品有显著差异($P < 0.05$); n.s.表示无显著性差异; 不同字母表示处理组间有显著差异($P < 0.05$), 下同

Fig. 2 Relative abundance of the dominant phyla among different samples

(a) Proteobacteria; (b) Firmicutes; (c) Chloroflexi; (d) Actinobacteria; (e) Deinococcus-Thermus; (f) Gemmatimonadetes; (g) Acidobacteria; (h) Fusobacteria. Significant results of pairwise comparisons of means between skin and gill for each of the four treatments are represented by * ($P < 0.05$); n.s. means no significant difference; the different letters mean significant difference between treatments ($P < 0.05$), the same below

肤中的相对丰度分别为5.78%、9.20%、4.79%、12.25%和13.19%，鳃中的相对丰度分别为9.39%、15.06%、4.64%、12.55%和14.90%(图3)。主坐标分析表明，健康罗非鱼皮肤和鳃样品细菌群落结构差异不明显(图4)。

2.2 攻毒后存活和濒死尼罗罗非鱼黏膜共生菌群落组成及差异

攻毒后存活罗非鱼皮肤共生菌主要类群：变形菌门、异常球菌—栖热菌门、厚壁菌门、

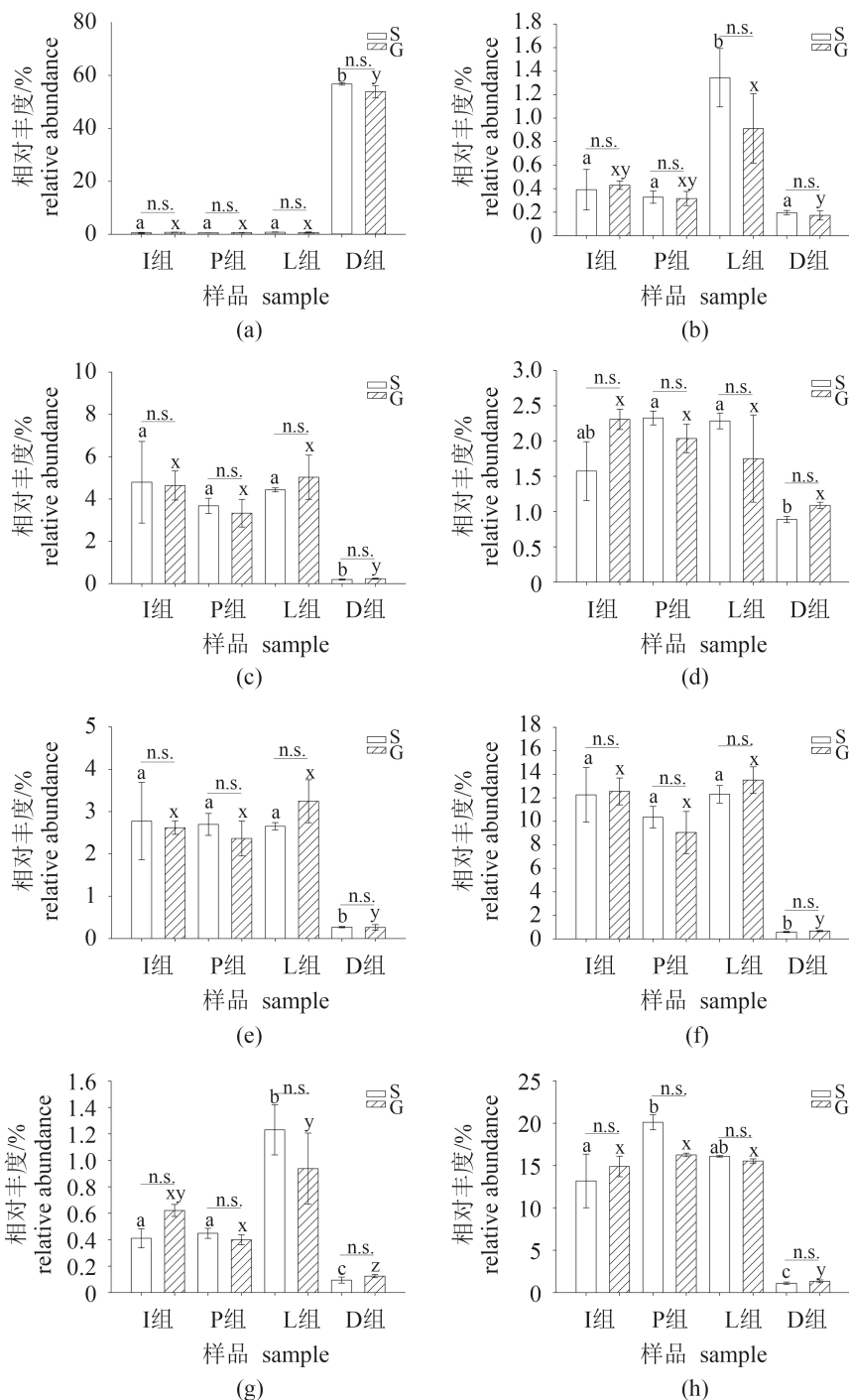


图3 不同样品差异显著的主要细菌属的相对丰度

(a) 链球菌属; (b) 紫色杆菌属; (c) 弓形杆菌属; (d) 硫单胞菌属; (e) 假交替单胞菌属; (f) 海单胞菌属; (g) 假单胞菌属; (h) 弧菌属

Fig. 3 Relative abundances of the dominant genera that significantly changed among different samples

(a) *Streptococcus*; (b) *Janthinobacterium*; (c) *Arcobacter*; (d) *Sulfurimonas*; (e) *Pseudoalteromonas*; (f) *Marinomonas*; (g) *Pseudomonas*; (h) *Vibrio*

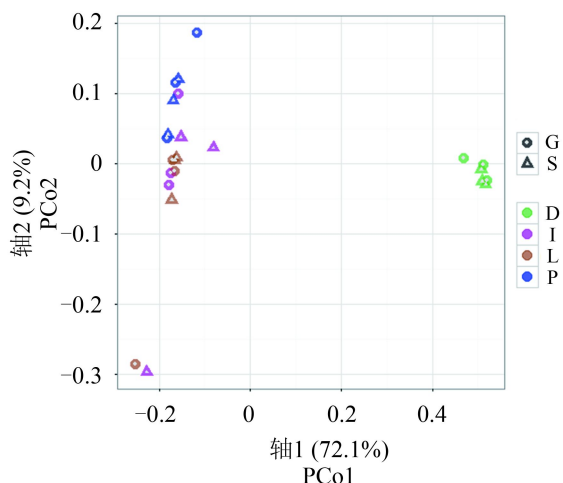


图4 罗非鱼皮肤和鳃样品细菌群落主坐标分析

Fig. 4 Principal coordinates analysis (PCoA) of the bacterial community from *O. niloticus* skin and gill samples

绿弯菌门和放线菌门, 平均相对丰度分别为75.6%、8.7%、5.6%、3.3%和2.6%, 合计占总细菌序列数的95.8%(图1)。鳃丝共生菌主要类群: 变形菌门、异常球菌—栖热菌门、厚壁菌门、绿弯菌门和放线菌门, 平均相对丰度分别为73.1%、6.7%、5.9%、4.5%和2.5%, 合计占总细菌序列数的92.7%(图1)。

攻毒后濒死尼罗罗非鱼皮肤共生菌主要类群: 厚壁菌门、变形菌门、异常球菌—栖热菌门、绿弯菌门和放线菌门, 平均相对丰度分别为61.2%、23.0%、6.0%、4.3%和3.0%, 合计占总细菌序列数的97.5%(图1)。鳃丝共生菌主要类群: 厚壁菌门、变形菌门、异常球菌—栖热菌门、绿弯菌门和放线菌门, 平均相对丰度分别为58.2%、24.4%、7.2%、4.5%和3.0%, 合计占总细菌序列数的97.3%(图1)。对比发现, 攻毒后濒死尼罗罗非鱼皮肤和鳃的厚壁菌门相对丰度显著高于存活尼罗罗非鱼样品($P<0.05$), 这可能是由于属于厚壁菌门的无乳链球菌成为了濒死尼罗罗非鱼黏膜的优势菌群, 一些原始的优势菌群(如变形菌门和酸杆菌门)含量显著下降($P<0.05$)(图2)。

与无乳链球菌攻毒后存活尼罗罗非鱼皮肤样品、初始皮肤样品和PBS组皮肤样品相比, 濒死尼罗罗非鱼皮肤样品中的弓形杆菌属、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海单胞菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和弧菌属的相对丰度显

著下降($P<0.05$)。攻毒后濒死尼罗罗非鱼皮肤样品中的紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)含量显著低于存活尼罗罗非鱼样品($P<0.05$), 但与初始样品和PBS组样品差异不显著。与无乳链球菌攻毒后存活尼罗罗非鱼鳃样品、初始鳃样品和PBS组鳃样品相比, 濒死尼罗罗非鱼鳃样品中的弓形杆菌属、假交替单胞菌属、海单胞菌属、假单胞菌属和弧菌属的相对丰度显著下降($P<0.05$)(图3)。无乳链球菌攻毒后的濒死尼罗罗非鱼皮肤和鳃样品中的链球菌属(*Streptococcus*)含量分别占总菌群的 $56.81\%\pm 0.47\%$ 和 $53.88\%\pm 2.30\%$, 显著高于无乳链球菌攻毒后存活罗非鱼($0.81\%\pm 0.08\%$ 和 $0.69\%\pm 0.21\%$)、健康罗非鱼($0.56\%\pm 0.20\%$ 和 $0.76\%\pm 0.08\%$)和注射PBS组罗非鱼($0.65\%\pm 0.02\%$ 和 $0.67\%\pm 0.06\%$)($P<0.05$)(图3)。

主坐标分析表明, 无乳链球菌攻毒后存活与濒死尼罗罗非鱼样品中细菌群落结构差异明显, 但无乳链球菌攻毒后的存活尼罗罗非鱼样品和PBS对照组、健康尼罗罗非鱼细菌群落结构差异不明显(图4)。

2.3 细菌群落多样性

尼罗罗非鱼皮肤和鳃样品中的菌群多样性差异不明显, 无乳链球菌攻毒后濒死尼罗罗非鱼皮肤和鳃中的菌群多样性下降, 而无乳链球菌攻毒后存活尼罗罗非鱼样品的菌群多样性和初始组样品、PBS对照组样品差异不显著(图5)。

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌菌群特征

鱼类黏膜共生菌群在免疫中起到十分重要的作用^[1], 但目前对罗非鱼黏膜的共生菌群结构特征和其发挥作用的可能机制知之甚少。由于传统研究技术的局限性, 如平板培养法^[14]和DGGE法^[15]只能获得养殖鱼类黏膜共生菌群结构的部分信息, 本研究运用的Illumina MiSeq测序技术能更全面和系统地了解尼罗罗非鱼黏膜表面共生菌的结构。本研究发现健康尼罗罗非鱼(攻毒前样品)皮肤和鳃黏附细菌都存在优势菌群, 主要为特吕珀菌属、硫杆菌属、弓形杆菌属、海单胞菌属和弧菌属, 二者的共生菌群落结构差异不显著, 说明在人工养殖条件下, 健康尼罗罗非鱼皮肤和鳃的主要共生菌类群基本相同。但利用DGGE法研究海水网箱养殖青石斑鱼

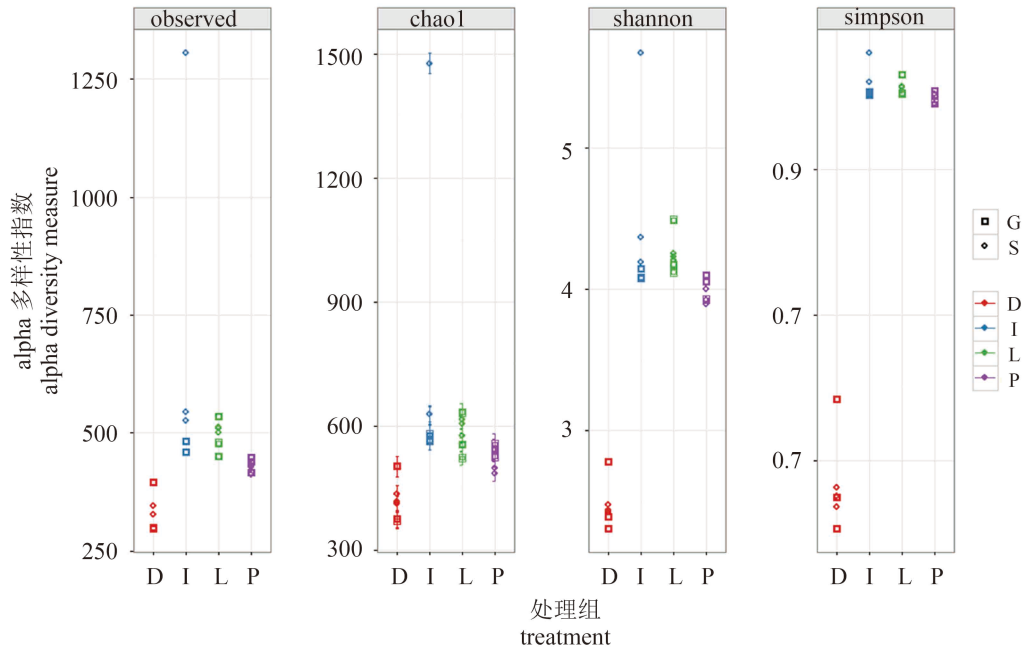


图5 不同处理组尼罗罗非鱼皮肤和鳃黏膜共生菌菌群种类丰度图

Fig. 5 Species richness plot of the bacterial community from *O. niloticus* skin and gill samples

(*Epinephelus awoara*)鳃和体表共生菌群发现, 鳃共生菌群结构简单, 存在绝对优势种群, 而体表共生菌群结构较为复杂, 无绝对优势种群, 二者共生菌群结构存在较大差异(相似度52%)^[15], 这可能与鱼种类不同有一定关系。因此, 需要进一步研究规模养殖的罗非鱼黏膜共生菌结构, 为了解共生菌的抗逆作用提供基础数据。

3.2 黏膜共生菌菌群对尼罗罗非鱼健康的指示意义

皮肤和鳃表面菌群在鱼类适应生存环境和抵抗病原菌中起到重要作用。对大菱鲆^[16], 褐鳟(*Salmo trutta*)、北梭鱼(*Esox lucius*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[18]等的研究表明, 其体表和鳃的黏附菌群显著不同于水体。在同一水域, 不同种类鱼体表的菌群结构也差异很大^[19]。对游动迅速的海洋鱼类皮肤黏附菌的结构研究发现, 这些菌能够分泌疏水性黏液, 改变鱼皮的特性, 减少摩擦而有助于鱼类游动^[20], 鱼体表的共生菌可能与鱼类适应环境相关。另外, 对养殖场海水、体表黏液和排出水的菌群结构研究发现, 健康大菱鲆的体表和濒死大菱鲆的体表细菌组成有很大差异^[5]。实验通过对比无乳链球菌感染前后尼罗罗非鱼

皮肤和鳃的菌群结构, 发现攻毒后存活的尼罗罗非鱼体表菌群和未感染病原前无显著差异, 而濒死尼罗罗非鱼的体表菌群多样性下降, 其中弓形杆菌属、假交替单胞菌属、海单胞菌属、假单胞菌属和弧菌属等含量显著下降。这些细菌对罗非鱼抗病力的影响值得探讨。目前已有研究表明, 从养殖水体中分离的荧光假单胞菌对鳗弧菌(*V. anguillarum*)有抑制作用^[21]。将大西洋鲑(*Salmo salar*)幼鱼浸浴于荧光假单胞菌液中可降低压力引起的疖疮病的死亡率^[22]。假单胞菌属细菌提高了尼罗罗非鱼的生产性能和健康状况^[23]。假交替单胞菌属细菌能产生多种活性物质, 也具有抑制病原菌的作用^[24]。病原菌能够改变鱼体表的菌群结构, 鱼类黏膜共生菌的群落结构与鱼体健康状况之间存在一定的关系, 需要进一步增加实验样本来源和样本数量为研究二者的关系提供直接证据。

细菌多样性在维持肠道生态功能方面有重要作用, 多样性的降低可能导致细菌群落功能稳定性的降低, 从而增加养殖生物患病的风险^[25]。运用454高通量测序方法研究半滑舌鳎肠道细菌组成, 发现染病鱼肠道中细菌的多样性显著低于健康鱼^[4]。利用Illumina测序方法对健康和发病凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道多样性研究发现, 发病对虾肠道细菌多样性显著低于健

康对虾^[26]。本研究发现, 无乳链球菌攻毒后濒死尼罗罗非鱼表皮和鳃的细菌多样性低于攻毒后存活个体, 说明细菌多样性不仅在养殖动物肠道内具有重要的调节作用, 在鱼表皮和鳃的黏膜免疫过程中也具有重要作用。

综上所述, 本研究通过运用高通量测序技术, 获得了尼罗罗非鱼表皮和鳃黏膜共生菌菌群结构特征, 并分析了无乳链球菌攻毒后存活和濒死尼罗罗非鱼样品的差异菌群, 经过将来更大规模的调查, 分析能够指示养殖罗非鱼健康状况的菌群种类或结构组成, 以期应用于生产, 并推广到其他鱼类养殖中。

参考文献:

- [1] 姜红烨, 黄艳, 余新炳. 鱼的黏膜免疫研究进展[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(8): 1150-1153.
Jiang H Y, Huang Y, Yu X B. Review of fish mucosal immunity research[J]. Journal of Tropical Medicine, 2015, 15(8): 1150-1153(in Chinese).
- [2] Littman D R, Pamer E G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(4): 311-323.
- [3] Musharrafieh R, Tacchi L, Trujeque J. *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 169(1-2): 80-88.
- [4] 张正, 廖梅杰, 李彬. 两种疾病发生对养殖半滑舌鳎肠道菌群结构的影响分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1565-1572.
Zhang Z, Liao M J, Li B. Study on cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) intestinal microflora changes affected by different disease occurrence[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1565-1572(in Chinese).
- [5] Austin B. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit[J]. Journal of Applied Microbiology, 1982, 53(2): 253-268.
- [6] FAO. The state of world fisheries and aquaculture[R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.
- [7] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 75-79.
- Lu M X. Review of research on streptococcosis in tilapia[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(1): 75-79(in Chinese).
- [8] 霍欢欢, 可小丽, 卢迈新. 海南罗非鱼无乳链球菌血清型及耐药性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 350-354.
- Huo H H, Ke X L, Lu M X. Serotype and drug resistance of *Streptococcus agalactiae* from tilapia farmed in Hainan Province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(5): 350-354(in Chinese).
- [9] 卢迈新, 黎炯, 叶星. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.
- Lu M X, Li J, Ye X. Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan Provinces[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 766-774(in Chinese).
- [10] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [11] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [12] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [13] R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing[M]. Vienna: R foundation for statistical computing, 2012.
- [14] Al-Harbi A H, Uddin N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia[J]. Aquaculture, 2005, 250(3-4): 566-572.
- [15] 刘玉春, 周志刚, 石鹏君. 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. 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).
- [16] Mudarris M, Austin B. Quantitative and qualitative studies of the bacterial microflora of turbot, *Scoph-*

- thalmus maximus* L., gills[J]. Journal of Fish Biology, 1988, 32(2): 223-229.
- [17] González C J, López-Díaz T M, García-López M L. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(11): 1270-1277.
- [18] Wang W W, Zhou Z G, He S X. Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of polycultured gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih)[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(9): e72-e83.
- [19] Larsen A, Tao Z, Bullard S A. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 85(3): 483-494.
- [20] Sar N, Rosenberg E. Fish skin bacteria: colonial and cellular hydrophobicity[J]. Microbial Ecology, 1987, 13(3): 193-202.
- [21] Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, *et al.* Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 969-973.
- [22] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad[J]. Journal of Fish Diseases, 1993, 6(5): 521-524.
- [23] El-Rhman A M A, Khat tab Y A, Shalaby A M. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 175-180.
- [24] 席宇, 朱大恒, 刘红涛. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.
- Xi Y, Zhu D H, Liu H T. Advances on *Pseudoalteromonas* species and their extracellular bioactive compounds[J]. Microbiology China, 2005, 32(3): 108-112(in Chinese).
- [25] Jones S E, Lennon J T. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(13): 5881-5886.
- [26] 吴金凤, 熊金波, 王欣. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. 应用生态学报, 2016, 27(2): 611-621.
- Wu J F, Xiong J B, Wang X. Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(2): 611-621(in Chinese).

The commensal microbiota structure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin and gill surfaces and preliminary study of their implications on tilapia health status

WANG Miao, LU Maixin*, YI Mengmeng, CAO Jianmeng, GAO Fengying

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Fish mucosa and their commensal microbiota serve as the first biological bulwark against invading pathogens. The purpose of this study is to study the implications on tilapia health status of the associated commensal microorganisms. Illumina sequencing was used to study the difference between the microbiota of mucosal surfaces from healthy tilapia, live and dying tilapia after *Streptococcus agalactiae* infection. The results showed that there were several genera dominated on tilapia skin and gill surfaces, i.e., *Truepera*, *Thiobacillus*, *Arcobacter*, *Marinomonas*, and *Vibrio*. There was no significant difference between the skin and gill microbiota of the live tilapia after *Streptococcus agalactiae* infection and those of the initial tilapia sample. A decreased bacterial diversity was shown in the skin and gill microbiota of the dying tilapia after the pathogen infection, and the genera of *Arcobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Pseudomonas* and *Vibrio* were decreased, while the genus of *Streptococcus* dominated in the skin and gill microbiota of the dying tilapia after the pathogen infection, with the relative abundance of $55.30\% \pm 1.24\%$. The results suggested that commensal microbiota of tilapia skin and gill surface could be related to fish health.

Key words: *Oreochromis niloticus*; skin; gill; commensal microbiota; high-throughput sequencing

Corresponding author: LU Maixin. Email: mx-lu@163.com

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Science (2015A02XK02; 2016HY-ZD1403); Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201401B04); China Agriculture Research System (CARS-49)