

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)引起斑马鱼肠道生理损伤和肠道菌群失调*

孙 雯^{1,2} 王永杰^{1,2}① 鲍俊杰^{1,2} 张 静^{1,2} 陈红莲^{1,2} 熊英琪^{1,2}

(1. 安徽省农业科学院水产研究所 安徽合肥 230031; 2. 水产增养殖安徽省重点实验室 安徽合肥 230031)

摘要 研究分析了嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染斑马鱼后肠道生理健康和肠道微生物的变化。以斑马鱼为研究对象,刮伤皮下真皮,使用 10^5 CFU/mL 浓度的嗜水气单胞菌暴露 6 h 后转入清水,分别在暴露前、暴露后 6 h、12 h、24 h 取样。使用鱼特异性酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,检测肠道中紧密连接蛋白 ZO-2 (TJP2)含量和乙氧基异戊二烯-O-脱乙酰基酶(EROD)酶活性,结果表明,嗜水气单胞菌暴露引起了斑马鱼肠道生理损伤,表现为肠道 TJP2 含量、EROD 酶活性在暴露后显著下调。采用 16S rRNA 高通量测序检测肠道微生物及其菌群结构变化,嗜水气单胞菌暴露斑马鱼后致病菌不动杆菌属(*Acinetobacter*)明显增加,OTUs 数量明显下降,Alpha 多样性降低,结果说明嗜水气单胞菌引起了斑马鱼肠道菌群失调。肠道中微生物的多样性与改善肠道上皮和黏膜屏障功能紧密相关,该研究对从肠道健康的角度评价嗜水气单胞菌毒性,探索嗜水气单胞菌的致病机制具有重要意义。

关键词 嗜水气单胞菌; 斑马鱼; 肠道微生物; Alpha 多样性; TJP2

中图分类号 S917.1 doi: 10.11693/hyhz20221000254

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)在自然界中分布广泛,是一种典型的人鱼共患病的条件致病菌,感染致病性嗜水气单胞菌可导致人腹泻、食物中毒和继发感染(杨守明等, 2006)。嗜水气单胞菌感染鱼类种类众多,可以引起罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、鲶鱼(*Silurus asotus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等鱼类细菌性败血症,其致死率高、流行广,严重制约了中国水产养殖业的发展(Jones *et al.*, 1995; Da Silva *et al.*, 2012; Prayitno *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022)。因此,研究嗜水气单胞菌对鱼类的致病性特征及其可能的致病机理,对渔业生产具有重要意义。

气单胞菌的致病性与环境的变化(温度变化、含氧量降低、氨氮升高)有关(白晓倩, 2016; 孟令杰, 2017; 孙元琛等, 2022)。目前有研究表明,气单胞菌感染的同时往往存在混合感染的情况(聂慧慧, 2016),

肠道微生物存在的共生菌通过竞争营养物质和肠黏膜的附着点即生态位来抑制病原菌的生长增殖(查继伟, 2019)。有研究表明,芽孢杆菌益生菌添加在饲料中,能够增加中华绒螯蟹对嗜水气单胞菌致病菌的抵抗力(陈文典, 2009),气单胞菌与其他细菌存在相互作用,而它的致病性可能依赖于肠道菌群的组成(查继伟, 2019)。

肠道是机体一种重要的免疫器官,其中,肠道微生物与肠道黏膜间的交流和免疫系统密切相关(徐绍刚等, 2019),但目前人们对肠道微生物与肠道黏膜屏障的调控机制研究仍在初级阶段。稳定的肠道微生物区系影响着宿主的多种功能,在宿主的生长发育、营养、食物消化、免疫反应以及抵抗病原菌等方面发挥了重要作用(郭军等, 2019; 盛鹏程等, 2020)。研究嗜水气单胞菌对鱼类肠道黏膜屏障及肠

* 安徽省农业科学院科研团队计划项目, 2022YL010 号; 安徽省现代农业产业技术体系建设专项, 皖农科函[2021] 711 号。
孙 雯, 硕士, E-mail: 936728828@qq.com

通信作者: 王永杰, 研究员, E-mail: hfwangyongjie@163.com

收稿日期: 2022-10-08, 收修改稿日期: 2022-11-17

道微生物的影响,对评价嗜水气单胞菌毒性,以及从肠道健康的角度,探索嗜水气单胞菌的致病机制具有重要意义。

斑马鱼因其体型小、生长快、完备的遗传系统和基因组资源,已成为脊椎动物发育和人类疾病的重要模型(Neely *et al*, 2002)。本研究使用嗜水气单胞菌暴露成年斑马鱼后,采用 ELISA 和 16S rRNA 高通量测序,检测斑马鱼肠道生理指标及肠道微生物的变化,评价嗜水气单胞菌对肠道健康的影响,探索嗜水气单胞菌可能的毒性机制。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜水气单胞菌(J5L09)来源于合肥养殖基地的患细菌性败血症异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)体内分离并保存于实验室。实验所用的 4 月龄成年斑马鱼(*Danio rerio*, AB 株),从中国科学院水生生物研究所的斑马鱼育种中心(武汉,中国)购买,在安徽省农业科学院水产研究所进行室内循环水养殖实验。

1.2 养殖及暴露实验

成年斑马鱼的养殖依据 Yu 等(2010)提出的养殖方案进行。养殖过程中保持水温在(28±0.5) °C,光暗周期为 14 h : 10 h,每日喂食丰年虫两次。4 月龄成年斑马鱼暂养 14 d 无死亡后开始暴露实验。麻醉后,用无菌手术刀沿胸鳍后方侧面刮除几片鳞片,并刮伤皮下真皮。麻醉恢复后用(10⁵ CFU/mL)嗜水气单胞菌浸泡 6 h 后转入清水中,分别在暴露前和暴露后 6 h、12 h、24 h 时进行取样。

1.3 肠道采集

取样前需禁食 24 h,用 0.03%的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)对斑马鱼进行麻醉,MS-222 是一种经过美国食品与药物管理局(FDA)认可的渔用麻醉剂,且对人体和水产品没有副作用。麻醉后使用无菌的剪刀和镊子解剖,取得的斑马鱼肠道放在无菌的 EP 管中。随后立即使用液氮冷冻,放置在-80 °C,用于后续提取 DNA。

1.4 肠道生理指标的测定

把 5 条肠道混作一个样,加入 9 倍组织体积的生理盐水。匀浆研磨充分后在 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液。使用紧密连接蛋白 ZO-2(TJP2)和乙氧基异戊二烯-O-脱乙酰基酶(EROD)的鱼特异性酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,按照说明书检测肠道中 TJP2 含量和 EROD 活性,试剂盒购买于南京建成。

1.5 肠道微生物群落总 DNA 提取

把 10 条肠道混作一个样,向每管样品加入 1 mL 裂解液,在 37 °C 下水浴 30 min,加入蛋白酶 K (100 μg/mL),随后 55 °C 水浴下裂解 12 h,在室温下恢复温度后,离心取其上清液,再进行抽提纯化,用氯化钠(0.1 倍体积)和无水乙醇(2 倍体积)沉淀 DNA,3 h 后用 70%乙醇清洗 DNA 沉淀,将 DNA 干燥后溶解于 40 μL TE,回收得到的 DNA 进行测序分析。

1.6 16S rRNA 高通量测序和分析

提取好的肠道菌群 DNA 用微量核酸蛋白分析仪测定其浓度和纯度,以肠道细菌 DNA 为模板,采用通用引物 341F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)扩增出细菌 16S DNA 序列。在进行数据处理过滤时(Fadrosh *et al*, 2014),使用内部撰写的程序对原始的测序数据进行处理,基于 OUT (Operational Taxonomic Units)聚类的 Vsearch 方法进行序列拼接,质量过滤,去重,聚类(Rognes *et al*, 2016)。使用朴素贝叶斯(Naive Bayes)分类器完成注释,根据注释结果统计各样本在不同分类水平中的分类单元数量(唐亚鹏等, 2022)。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌暴露对斑马鱼肠道生理的影响

2.1.1 肠道中 TJP2 的含量 对暴露前后肠道中紧密连接蛋白 TJP2 的含量进行检测,结果如图 1,在嗜水气单胞菌暴露斑马鱼 12 h 和 24 h 后,肠道中 TJP2 的含量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.1.2 肠道中 EROD 酶活 检测暴露前后肠道中 EROD 活性,代表解毒能力的 EROD 活性随暴露时间

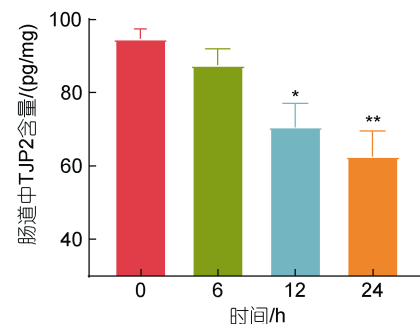


图 1 斑马鱼肠道中 TJP2 的含量

Fig.1 TJP2 content in the intestinal tract of zebrafish
注: 0 表示未暴露前的斑马鱼肠道样本, 6、12、24 表示暴露后 6 h、12 h、24 h 的肠道样本。数据表示平均值±标准误差(mean±SEM)。* $P<0.05$ 表示暴露组相对于未暴露组具有显著差异,** $P<0.01$ 表示暴露组相对于未暴露组具有显著差异具有极显著差异。下同

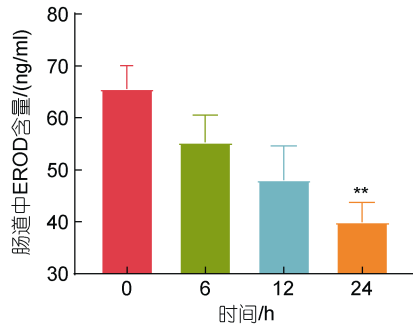


图 2 斑马鱼肠道中 EROD 的活性

Fig.2 EROD activity in the intestinal tract of zebrafish

的增加而降低, 在嗜水气单胞菌暴露 24 h 后, 斑马鱼肠道中 EROD 的活性显著降低($P < 0.01$)。

2.2 嗜水气单胞菌暴露对斑马鱼肠道微生物的影响

2.2.1 样本数据统计和测序质量分析

高通量测序后, 如表 1 所示, 共获得有效序列条数为 475 434 条。把序列按照随机抽样的方法, 通过测序数据量以及 OTU 数量构建稀释曲线, 可见图 3 中各样本的曲线趋于平缓, 说明测序的数据量合理, 目前的 OTU 数量可以代表各组的微生物信息。

表 1 各样本数据信息统计
Tab.1 Statistics of the sample data

样本	序列条数/条	序列碱基数/个	序列平均长度/bp
A1	41 142	17 095 074	415.51
A2	43 262	17 887 195	413.46
A3	48 064	19 964 359	415.37
B1	41 347	16 957 275	410.12
B2	33 839	14 012 151	414.08
B3	45 051	18 749 575	416.19
C1	38 236	15 895 941	415.73
C2	46 737	19 544 416	418.18
C3	30 152	12 493 168	414.34
D1	33 764	14 052 305	416.19
D2	43 831	18 322 347	418.02
D3	30 009	12 525 538	417.39

注: A、B、C、D 组分别为暴露前和暴露后 6 h、12 h、24 h 的肠道样本, 每组分别设置 3 个平行

2.2.2 基于 OTU 的 VENN 图

VENN 图显示样本中共有和独有 OTU 数目, 表明样品 OTU 数目的组成相似性和重叠情况, OTU 的丰度能够初步体现样品的物种丰富程度。如图 4 所示, 未暴露前, 斑马鱼肠道细菌获得 OTU 368 个, 在暴露后 6 h、12 h、24 h 后, 斑马鱼肠道细菌分别获得 OTU 246、253 个、226 个。

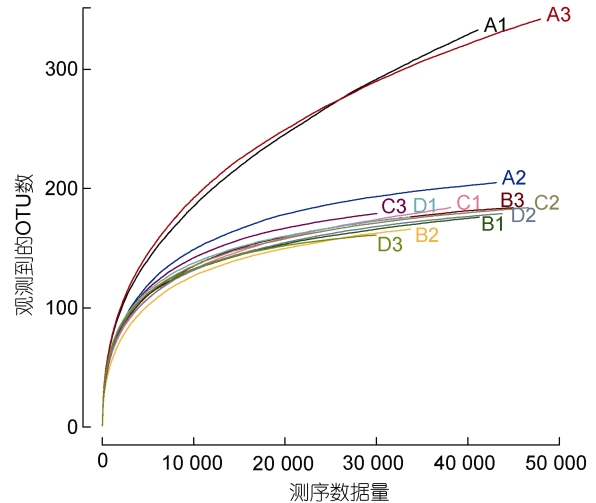


图 3 物种数目饱和度稀释曲线

Fig.3 Curve of the species-number saturation dilution of the samples

注: A 组为未暴露前斑马鱼肠道样本, B、C、D 组分别为暴露后 6 h、12 h、24 h 的肠道样本

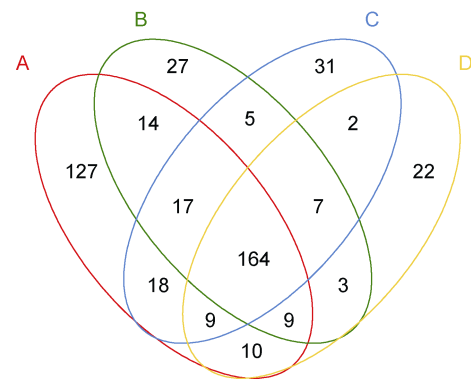


图 4 基于 OTU 的 VENN 图

Fig.4 The Venn diagram of the OTU distribution

2.2.3 肠道菌群的 Alpha 多样性

Alpha 多样性是对单个样品中物种多样性的分析(Schloss *et al*, 2009), 反映样品中群落的丰富度和物种均匀度。包括 ACE 指数、Chao 指数和 Richness 指数等。它们的指数越大, 说明样品中的物种越丰富。相比未暴露嗜水气单胞菌的对照组, 在暴露 6 h、12 h、24 h 后, 暴露组的 Alpha 多样性显著降低(图 5)。

2.2.4 Rank 曲线

Rank 曲线能够展现样品的物种多样性, 也能够反映物种的均匀程度和丰富程度。样品曲线越宽表示样品中物种组成越丰富, 样品曲线越平坦表示样品中物种组成的均匀度越高。由此可见, 暴露嗜水气单胞菌后, 斑马鱼样品中物种组成丰富度降低(图 6)。

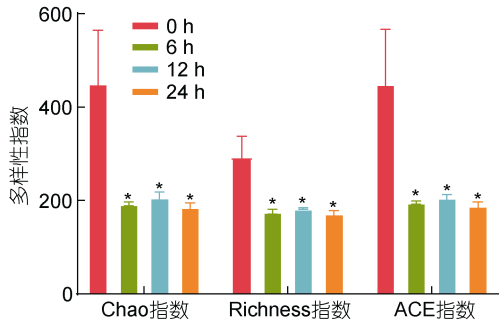


图 5 Alpha 多样性指数
Fig.5 The Alpha diversity index

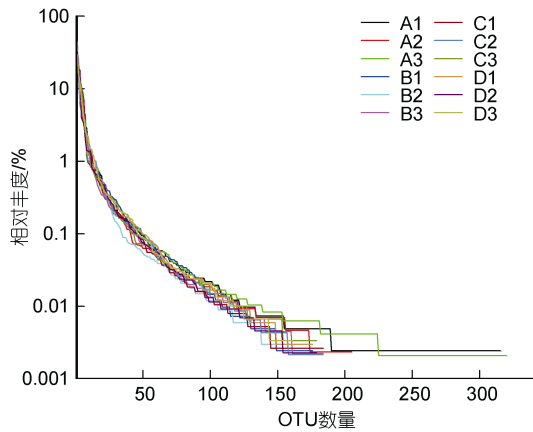


图 6 基于 OTU 的 Rank 曲线
Fig.6 The rank-abundance of the OTU distribution

2.2.5 门和属水平物种丰度 如图 7 所示, 在门水平上, 对照组肠道菌群中, 变形菌门(Proteobacteria)、

拟杆菌门(Bacteroidota)和放线菌门(Actinobacteriota)占主导地位, 但相对丰度不同。其中, 变形菌门所占比例为 36.87%, 拟杆菌门所占比例为 36.11%, 放线菌门所占比例为 26.53%。值得注意的是, 在嗜水气单胞菌暴露斑马鱼 12 h 和 24 h 后, 放线菌门所占比例分别降低了 28.95%和 17.75%。

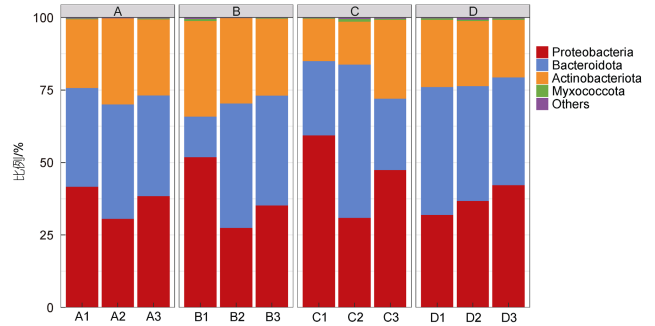


图 7 在门水平上的肠道菌群群落结构柱状图
Fig.7 Histogram of community structure of the intestinal flora at phylum level

在属水平上(图 8), 与对照组相比, 暴露 6 h、12 h、24 h 后, 肠道菌群中 *Reyranella* 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 分枝杆菌属(*Mycobacterium*) 在暴露 12 h、24 h 后显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$), 肠道菌群中的不动杆菌属(*Acinetobacter*)在暴露 24 h 后也明显增加。

2.2.6 主成分分析(PCA) 采用无参数多变量方差分析, 比较样本的群落组成。图 9 的结果显示, 在

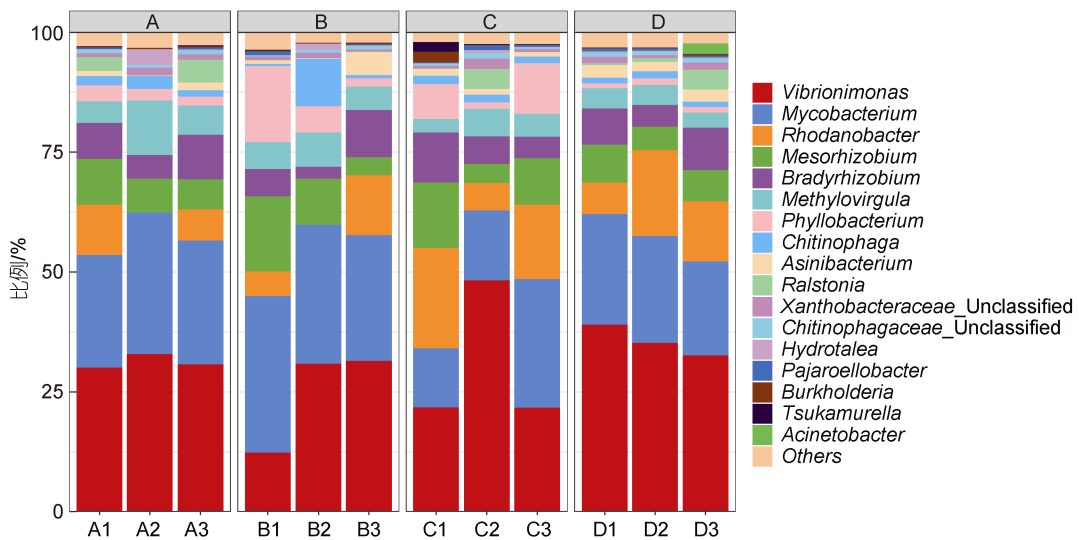


图 8 在属水平上的肠道菌群群落结构柱状图
Fig.8 Histogram of community structure of the intestinal flora at genus level

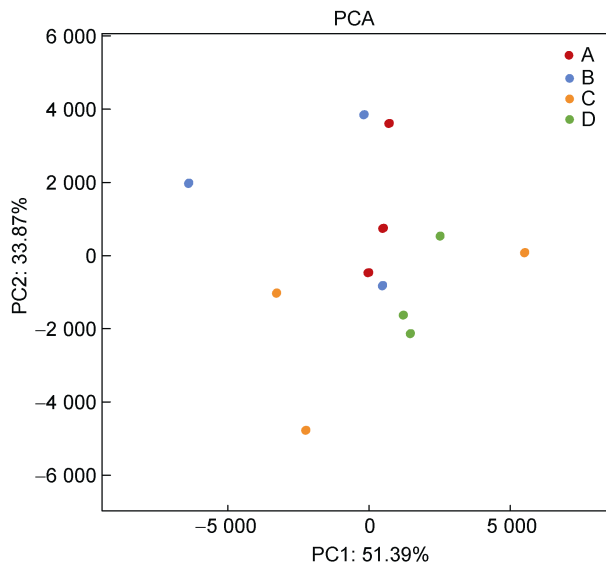


图 9 斑马鱼肠道菌群的主成分分析

Fig.9 Principal component analysis of intestinal flora in zebrafish

注: 图中点分别表示各个样品。不同颜色代表样品属于不同的分组。A 组为未暴露前斑马鱼肠道样本, B、C、D 组分别为暴露后 6 h、12 h、24 h 的肠道样本

暴露嗜水气单胞菌 12 h、24 h 之后, 斑马鱼肠道菌群的相似性发生了偏移, 样品在 OTU 水平上的群落组成存在差异。

3 讨论

肠道是消化和吸收营养的主要器官, 其完整性对鱼类的健康至关重要(Jutfelt *et al*, 2007)。肠黏膜屏障功能的损伤与多种肠道疾病的发生密切相关(关玮, 2011), 紧密连接(tight junction, TJ)蛋白是肠上皮屏障的关键成分(Chasiotis *et al*, 2012), TJP2 是最重要的 TJ 蛋白之一, 常被用作肠上皮屏障完整性和通透性的指标(Rhee *et al*, 2009)。本研究中, 在暴露嗜水气单胞菌 12 h、24 h 后, 斑马鱼肠道中 TJP2 的含量显著降低, 这表明, 嗜水气单胞菌暴露损伤了肠上皮屏障的完整性, 提示了嗜水气单胞菌对肠道功能有潜在的干扰作用。有研究表明, 感染嗜水气单胞菌的斑马鱼, 肠道组织切片上可观察到有明显的肠道上皮损伤, 肠道上皮结构被破坏, 表现为上皮细胞脱落, 缘状纹减少(Wang *et al*, 2016)。嗜水气单胞菌可导致鲤鱼肠道黏膜屏障损伤(Jung-Schroers *et al*, 2018)。嗜水气单胞菌引起的金钱鱼(*Scatophagus argus*)细菌性疾病的发病金钱鱼, 与正常的金钱鱼相比, 其肠绒毛结构消失, 肌肉层疏松明显(张庆华等, 2016)。

本研究中, 在暴露嗜水气单胞菌 24 h 后, 斑马鱼肠道中 EROD 活性显著降低。EROD 活性变化能够反映机体解毒代谢的能力(肖国强等, 2013), 是公认鱼类生物效应标记物(Kammann *et al*, 2005), 其活性可以指示暴露损伤(Whyte *et al*, 2000; Jönsson *et al*, 2003)。研究表明, 成年斑马鱼中, 暴露于 50 mg/L 对羟基苯甲酸甲酯(Methylparaben)会导致 EROD 活性显著降低(De Carvalho Penha *et al*, 2021)。最高温度导致暴露于除草剂丁硫脲(Butylthiourea)的美国牛蛙蝌蚪肝脏中 EROD 活性降低(Grott *et al*, 2021)。将黄盖鲮(*Pseudopleuronectes yokohamae*)暴露于污染沉积物(低浓度多氯联苯), 其 EROD 活性在 140 d 后下降 22% (Livingstone *et al*, 1993)。本研究中, 暴露后肠道 EROD 活性的降低, 指示了嗜水气单胞菌对斑马鱼肠道的生理损伤。

研究表明鱼类在环境变化后, 一些从门到属的 OTUs 会在肠道中大量改变(Adamovsky *et al*, 2018)。在本实验中, 嗜水气单胞菌暴露斑马鱼后, 肠道菌群中 OTU 数量明显下降。Rank 曲线表明, 暴露后组别比暴露前组别分布更窄, 物种组成丰富度降低。PCA 分析结果显示, 暴露改变了斑马鱼肠道菌群的结构。通过 Chao 指数、Richness 指数和 ACE 指数可以看出, 与对照组相比, 嗜水气单胞菌暴露斑马鱼后的 Alpha 多样性显著降低。很多研究也表明, 环境中的有害物质暴露能够导致肠道菌群的改变以及 Alpha 多样性的变化(Chen *et al*, 2018; Qiao *et al*, 2019)。重复损伤导致斑马鱼肠道屏障功能恢复受损, 肠道菌群失调(Chuang *et al*, 2019)。用含有二氯苯氧氯酚的食物暴露成年斑马鱼 4~7 d, 可导致斑马鱼肠道菌群结构快速变化、Alpha 多样性显著降低(Gaulke *et al*, 2016)。本研究中嗜水气单胞菌暴露后, 斑马鱼肠道菌群失调, 表现为微生物物种组成减少, Alpha 多样性快速降低, 这指示了嗜水气单胞菌暴露对斑马鱼的肠道损伤。与本研究结果不同的是, 采用长期浸泡的方法使嗜水气单胞菌感染草鱼, 导致草鱼物种丰富度指数增加, Alpha 多样性有所增加(李东亮, 2016)。

在门水平上, 斑马鱼肠道菌群中变形菌门、拟杆菌门和放线菌门占主导地位, 但相对丰度不同。Roeselers 等(2011)研究了在不同国家和地区的斑马鱼肠道菌群组成, 发现斑马鱼肠道中的核心菌群为变形菌门、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、放线菌门和拟杆菌门。在嗜水气单胞菌暴露斑马鱼

12 h 和 24 h 后,放线菌门所占比例有所降低。本研究中,在暴露嗜水气单胞菌 24 h 后,肠道菌群中的不动杆菌属(*Acinetobacter*)大量增加。不动杆菌属是一种机会致病菌,常存在机体呼吸道、消化道,当机体抵抗力较低时可致病(袁秀梅等, 2001)。人工感染结果表明,不动杆菌属分离株对泥鳅、斑马鱼和线虫(*Caenorhabditis elegans*)都具有致病性和高毒性(Wang *et al.*, 2020)。本研究中肠道菌群不动杆菌属的大量增加,可能是导致肠道健康受损的原因。

肠道健康,包括黏膜上皮屏障功能完整和微生物平衡(Bischoff, 2011),肠道黏膜屏障将宿主内部与外部环境分隔开,并阻挡潜在的有害物质(姚鹏等, 2021),肠道微生物对维持肠黏膜屏障功能、调节免疫功能和促进营养物质的代谢吸收等具有重要作用(段云峰等, 2022)。研究表明,牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)通过 IL9 产生 CD4+T 细胞,改变肠道菌群、破坏上皮屏障功能,间接引发肠道炎症(Sohn *et al.*, 2022)。枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌可改善拉氏鳊(*Rhynchocypris lagowskii*)肠道形态、消化和吸收酶活性,增强肠道黏膜免疫和屏障功能,维持肠道微生物平衡(Lei *et al.*, 2022)。黏膜屏障功能障碍可能与肠道菌群失调有关(Xia *et al.*, 2022),石斛多糖能通过改善肠道屏障功能,调节小鼠的肠道微生物群(胡乃华, 2022)。我们的研究结果表明,嗜水气单胞菌暴露引起了斑马鱼肠道生理损伤,表现为肠道 TJP2 含量、EROD 酶活性在暴露后显著下调。分析斑马鱼体内的肠道菌群种类发现,暴露后斑马鱼肠道内致病菌不动杆菌大量增加,增加了肠道受损的可能性。进一步对肠道微生物群落结构分析表明,嗜水气单胞菌暴露显著降低了斑马鱼肠道中的微生物 Alpha 多样性。肠道中微生物的多样性与改善肠道上皮和黏膜屏障功能紧密相关,在本研究中,肠道中致病菌的增加、Alpha 多样性的降低可能与 TJP2 含量、EROD 酶活性降低有关。

4 结论

本研究用嗜水气单胞菌暴露斑马鱼,在暴露后 24 h 内,采用 ELISA、16S rRNA 高通量测序检测肠道生理健康和肠道微生物变化情况。结果表明,在嗜水气单胞菌暴露后,斑马鱼肠道健康受损。表现为斑马鱼肠道 TJP2 含量、EROD 酶活性降低,肠上皮屏障受损。同时,肠道致病菌增加,Alpha 多样性降低,菌群失调。本研究结果提示了嗜水气单胞菌对肠道健

康的损害与风险,为肠道微生物与肠道生理健康的相互作用提供研究基础。

参 考 文 献

- 白晓倩, 2016. 4 株鳖源致病性嗜水气单胞菌对氨氮和亚硝酸盐的耐受与响应特征[D]. 舟山: 浙江海洋大学: 9-11.
- 关玮, 2011. 益生菌与肠黏膜屏障[C] // 2011 全国肠内肠外营养学术会议论文集. 郑州: 中华医学会: 74-77.
- 孙元琛, 徐冰洁, 曹艺筹, 等, 2022. 饲料中添加纳米氧化钾对氨氮与嗜水气单胞菌胁迫下中华绒螯蟹的保护效应[J]. 南方水产科学, 18(3): 94-101.
- 李东亮, 2016. 感染嗜水气单胞菌草鱼肠道菌群结构研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学: 33-36.
- 杨守明, 王民生, 2006. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 疾病控制杂志, 10(5): 511-514.
- 肖国强, 张炯明, 邵艳卿, 等, 2013. 苯并芘 B[a]P 对泥蚶组织 EROD、GST 酶活性和 MDA 含量的影响[J]. 海洋科学, 37(8): 28-34.
- 张庆华, 马文元, 陈彪, 等, 2016. 嗜水气单胞菌引致的金钱鱼细菌性病害[J]. 水产学报, 40(4): 634-643.
- 陈文典, 2009. 两种芽孢杆菌微胶囊制剂的研制及其对中华绒螯蟹免疫功能的影响[D]. 苏州: 苏州大学: 34-56.
- 孟令杰, 2017. 温度及细菌间作用对杀鲑气单胞菌致病性的影响[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所): 85-86.
- 胡乃华, 2022. 石斛多糖通过改善肠道屏障功能、调节肠道微生物群、减少氧化应激和炎症反应改善右旋糖酐-硫酸钠诱导的小鼠结肠炎[J]. 天然产物研究与开发, 34(1): 41.
- 查继伟, 2019. 斑马鱼肠道菌群协同竞争关系对嗜水气单胞菌感染的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学: 3-4.
- 段云峰, 蔡峰, 律娜, 等, 2022. 益生菌促进胃肠道健康的机制及应用[J]. 微生物学报, 62(3): 836-847.
- 姚鹏, 郝娜, 2021. 肠屏障功能与消化系统疾病关系的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 27(5): 785-787.
- 袁秀梅, 吴玲, 万宏, 2001. 多重耐药性溶血不动杆菌致病人术后感染 1 例[J]. 临床检验杂志, 19(5): 286-286.
- 聂慧慧, 2016. 鲤疱疹病毒 II 与嗜水气单胞菌混合感染致病性研究[D]. 武汉: 华中农业大学: 8-9.
- 徐绍刚, 张黎, 杨华莲, 等, 2019. 鲑科鱼类肠道微生物研究进展[J]. 中国水产(1): 104-106.
- 郭军, 吴杰, CHEN Y P, 等, 2019. 中华蜜蜂不同发育阶段肠道微生物的特征[C] // 2000—2018 中国蜂业科技前沿. 中国养蜂学会: 11-12.
- 唐亚鹏, 董世瑞, 田吉腾, 等, 2022. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)循环水养殖系统中养殖效果及菌群结构和功能研究[J]. 海洋与湖沼, 53(2): 466-474.
- 盛鹏程, 周冬仁, 韩新荣, 等, 2020. 不同饲养方式对乌鳢(*Ophiocephalus argus*)肠道微生物群落结构差异及种类多样性的影响[J]. 海洋与湖沼, 51(1): 148-155.
- ADAMOVSKY O, BUERGER A N, WORMINGTON A M, *et al.*, 2018. The gut microbiome and aquatic toxicology: an emerging concept for environmental health [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 37(11): 2758-2775.
- BISCHOFF S C, 2011. 'Gut health': a new objective in medicine? [J]. BMC Medicine, 9(1): 24.

- CHASIOTIS H, KOLOSOV D, BUI P, *et al*, 2012. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: a review [J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 184(3): 269-281.
- CHEN L G, GUO Y Y, HU C Y, *et al*, 2018. Dysbiosis of gut microbiota by chronic coexposure to titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A: Implications for host health in zebrafish [J]. *Environmental Pollution*, 234: 307-317.
- CHEN J J, ZHAO Y D, SUN D D, *et al*, 2022. Improvement of intestinal barrier, immunity, and meat quality in common carp infected by *Aeromonas hydrophila* using probiotics [J]. *Aquaculture International*, 30(1): 33-49.
- CHUANG L S, MORRISON J, HSU N Y, *et al*, 2019. Zebrafish modeling of intestinal injury, bacterial exposures and medications defines epithelial *in vivo* responses relevant to human inflammatory bowel disease [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 12(8): dmm037432.
- DA SILVA B C, MOURIÑO J L P, VIEIRA F N, *et al*, 2012. Haemorrhagic septicemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*×*Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture Research*, 43(6): 908-916.
- DE CARVALHO PENHA L C, COIMBRA ROLA R, DA SILVA JUNIOR F M, *et al*, 2021. Toxicity and sublethal effects of methylparaben on zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(33): 45534-45544.
- FADROSH D W, MA B, GAJER P, *et al*, 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq Platform [J]. *Microbiome*, 2(1): 6.
- GAULKE C A, BARTON C L, PROFFITT S, *et al*, 2016. Triclosan exposure is associated with rapid restructuring of the microbiome in adult zebrafish [J]. *PLoS One*, 11(5): e0154632.
- GROTT S C, BITSCHINSKI D, ISRAEL N G, *et al*, 2021. Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron [J]. *Science of the Total Environment*, 771: 144971.
- JONES B L, WILCOX M H, 1995. *Aeromonas* infections and their treatment [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(4): 453-461.
- JÖNSSON M, ABRAHAMSON A, BRUNSTRÖM B, *et al*, 2003. EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(3): 235-243.
- JUNG-SCHROERS V, ADAMEK M, HARRIS S, *et al*, 2018. Response of the intestinal mucosal barrier of carp (*Cyprinus carpio*) to a bacterial challenge by *Aeromonas hydrophila* intubation after feeding with β -1,3/1,6-glucan [J]. *Journal of Fish Diseases*, 41(7): 1077-1092.
- JUTFELT F, OLSEN R E, BJÖRNSSON B T, *et al*, 2007. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon [J]. *Aquaculture*, 273(2/3): 298-311.
- KAMMANN U, LANG T, VOBACH M, *et al*, 2005. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Dab (*Limanda limanda*) as Biomarker for Marine Monitoring (6 pp) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 12(3): 140-145.
- LEI X Y, ZHANG D M, WANG Q J, *et al*, 2022. Dietary supplementation of two indigenous *Bacillus* spp on the intestinal morphology, intestinal immune barrier and intestinal microbial diversity of *Rhynchocypris lagowskii* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(5): 1315-1332, doi: 10.1007/s10695-022-01121-0.
- LIVINGSTONE D R, LEMAIRE P, MATTHEWS A, *et al*, 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 26(11): 602-606.
- NEELY M N, PFEIFER J D, CAPARON M, 2002. *Streptococcus*-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis [J]. *Infection and Immunity*, 70(7): 3904-3914.
- PRAYITNO S B, RIYADI S, SARJITO, *et al*, 2021. The performance of survival and immunity of catfish (*Clarias gariepinus*) juvenile infected by *Aeromonas hydrophila* after treated by prebiotic extract in the diet [J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 1943(1): 012083.
- QIAO R X, DENG Y F, ZHANG S H, *et al*, 2019. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish [J]. *Chemosphere*, 236: 124334.
- RHEE S H, POTHOUKAKIS C, MAYER E A, 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6(5): 306-314.
- ROESELERS G, MITTGE E K, STEPHENS W Z, *et al*, 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. *The ISME Journal*, 5(10): 1595-1608.
- ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, *et al*, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. *PeerJ*, 4: e2584.
- SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, *et al*, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537-7541.
- SOHN J, LI L, ZHANG L X, *et al*, 2022. *Porphyromonas gingivalis* indirectly elicits intestinal inflammation by altering the gut microbiota and disrupting epithelial barrier function through IL9-producing CD4⁺ T cells [J]. *Molecular Oral Microbiology*, 37(2): 42-52.
- WANG X, LI J, CAO X J, *et al*, 2020. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen,

- Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1): 21-32.
- WANG Y, REN Z, FU L, *et al*, 2016. Two highly adhesive lactic acid bacteria strains are protective in zebrafish infected with *Aeromonas hydrophila* by evocation of gut mucosal immunity [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2): 441-451.
- WHYTE J J, JUNG R E, SCHMITT C J, *et al*, 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(4): 347-570.
- XIA B, WU W D, FANG W, *et al*, 2022. Heat stress-induced mucosal barrier dysfunction is potentially associated with gut microbiota dysbiosis in pigs [J]. *Animal Nutrition*, 8: 289-299.
- YU L Q, DENG J, SHI X J, *et al*, 2010. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 97(3): 226-233.

***AEROMONAS HYDROPHILA* CAUSED INTESTINAL PHYSIOLOGICAL DAMAGE AND INTESTINAL MICROBIAL DISORDER IN ZEBRAFISH**

SUN Wen^{1,2}, WANG Yong-Jie^{1,2}, BAO Jun-Jie^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, CHEN Hong-Lian^{1,2}, XIONG Ying-Qi^{1,2}
(1. *Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China*; 2. *Key Laboratory of Aquaculture & Stock Enhancement in Anhui Provincial, Hefei 230031, China*)

Abstract *Aeromonas hydrophila* is widely distributed in nature, and is a typical opportunistic pathogen of common diseases of human and fish. To understand the mechanism of its infection to fish, zebrafish was taken for this study. The subcutaneous dermis of the sample fish was scratched, and the wounded fish was exposed to *A. hydrophila* solution at a concentration of 10⁵ CFU/mL for 6 h. Samples were taken at 0, 6, 12, and 24 h after exposure. The changes of intestinal physiological health and intestinal microbiota of the fish were analyzed. Fish specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to detect the tight junction protein ZO-2 (TJP2) content and ethoxyisoprenoe-O-deethylase (EROD) activity in the intestine. Results show that after the exposure, the intestine of the zebrafish was damaged, and the intestinal TJP2 content and EROD enzyme activity were significantly down-regulated. As revealed by 16S rRNA high-throughput sequencing, the structures of intestinal microorganisms and their microbiota were altered, *Acinetobacter* was significantly increased, the number of OTUs were significantly decreased, the Alpha diversity was decreased, and the dysregulation of the intestinal microbiota was caused. The diversity of intestinal microorganisms was closely related to the improvement of intestinal epithelial and mucosal barrier function. This study provided a reference for studying the toxicity of *A. hydrophila* from the perspective of intestinal health and exploring the pathogenic mechanism of *A. hydrophila* in zebrafish.

Key words *Aeromonas hydrophila*; zebrafish; intestinal microbial; Alpha diversity; TJP2