刘双,徐聚臣,吕亚兵,等.水产药物对斑马鱼皮肤菌群及免疫应答的影响[J].华中农业大学学报,2026,45(1):289-299.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.01.026

水产药物对斑马鱼皮肤菌群及免疫应答的影响

刘双[1],徐聚臣[1],吕亚兵[1],范毅晖[1],侯杰[1,2],何绪刚[1,2]

1.华中农业大学水产学院,武汉 430070; 2.教育部长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心;/农业农村部水产养殖设施工程重点实验室,武汉 430070

摘要 为探究水产养殖中广泛使用抗生素与消毒剂对鱼类皮肤屏障健康的潜在风险,将斑马鱼(*Danio rerio*)分别暴露于25 μg/mL 利福平(rifampicin,RIF)、10 μg/mL 土霉素(oxytetracycline,OTC)、2 mg/L 高锰酸钾(potassium permanganate,$KMnO_4$)和0.1 mg/L 二氧化氯(chlorine dioxide,ClO_2)溶液12 h,通过实时荧光定量PCR和16S rRNA高通量测序分别检测斑马鱼皮肤免疫应答以及微生物菌群的变化。结果显示:抗生素和消毒剂的暴露使斑马鱼皮肤炎症相关基因白介素-1β(*IL-1β*)、白介素-6(*IL-6*)、肿瘤坏死因子-α(*TNF-α*)表达量显著上调($P<0.05$);免疫球蛋白*IgM*、补体*C3*以及黏蛋白*Muc2*基因的相对表达量也显著上调($P<0.05$);皮肤菌群的Alpha多样性指数显著降低($P<0.05$)。主坐标分析(PCoA)和度量多维尺度分析(NMDS)结果显示,对照组与暴露组微生物聚类出现显著分离;相较对照组,各暴露组变形菌门(Proteobacteria)相对丰度均增加,而拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度下降;各暴露组不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度上升,尤其是在$KMnO_4$暴露组中相对丰度高达65.36%。综上,抗生素与消毒剂暴露诱发斑马鱼皮肤出现炎症反应、共生菌群失调,削弱了皮肤的免疫屏障功能,进而损害鱼体健康。

关键词 抗生素; 消毒剂; 皮肤菌群; 炎症; 斑马鱼

中图分类号 S948; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)01-0289-11

一直以来,水产养殖业规模化发展伴生多重生态风险,如细菌性疾病频发[1]、养殖环境恶化[2]以及水产药物管理争议[3]等。其中,水产药物的管控策略已成为维系产业可持续发展与生态安全阈值的政策焦点[3]。抗生素因其低生物利用率和高水溶性在水生环境中残留,导致了水生生物抗生素耐药性的产生,进而诱导耐药基因水平转移并产生生物累积效应[4]。消毒剂对水生生物具有显著的毒性效应,其影响涵盖鱼类、无脊椎动物及初级生产者等多个生态位[5]。鱼类黏膜屏障(包括皮肤、鳃及肠道等组织)及其共生微生物群落构成宿主抵御外界胁迫的首道防线,在免疫调控与健康维持中发挥了核心作用[6]。现有研究多聚焦于抗生素、消毒剂对水生生物肠道免疫稳态及共生菌群结构的影响[7-8],而对直接接触水体的皮肤、鳃等黏膜相关影响鲜有报道。

本研究聚焦抗生素与消毒剂2类典型水产药物,选取利福平(rifampicin,RIF)和土霉素(oxytetracycline,OTC)2种广谱抗生素,以及高锰酸钾(potassium permanganate,$KMnO_4$)和二氧化氯(chlorine dioxide,ClO_2)2种消毒剂,以斑马鱼(*Danio rerio*)为测试生物,监测药物暴露后斑马鱼皮肤炎症相关因子、免疫球蛋白等的动态变化,分析体表微生物群落结构演变,解析药物暴露对鱼类皮肤免疫屏障功能的影响,以期为水产药物风险评估及水产养殖规范用药、指导等提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试动物及试剂

本试验所用4月龄成年斑马鱼购自湖北省武汉市辛安渡农场试验站,于华中农业大学淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心循环水系统中进行饲养。整个饲养阶段持续维持14 h光照/10 h黑暗的光周期条件,水温恒定于(28±0.5) ℃,每日定时投喂2次饲料,饲养周期不少于14 d以确保实验鱼生理状

收稿日期: 2025-05-14
基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFD2400901);湖北省重点研发计划项目(2023BBB007)
刘双,E-mail:1877672832@qq.com
通信作者: 何绪刚,E-mail:xgh@mail.hzau.edu.cn

态稳定[9]。试验用抗生素RIF(纯度≥93%)与OTC(纯度≥90%)购自武汉鸿昇生物科技有限公司,分别使用二甲基亚砜溶解配制成50、20 g/L母液备用。RIF和OTC暴露浓度参考相关文献,终质量浓度分别为25[10]和10 μg/mL[11],属于高剂量抗生素暴露模型,旨在探究抗生素暴露后的机体效应。消毒剂选用$KMnO_4$和ClO_2,参考中华人民共和国农业标准《无公害食品 渔用药物使用准则》(NY 5071—2002),选择治疗浓度消毒剂进行试验,质量浓度分别为2.0和0.1 mg/L,经预试验验证该浓度下24 h暴露未引起斑马鱼死亡。本研究所有动物试验均遵循华中农业大学动物伦理规范。

1.2 抗生素和消毒剂暴露试验

将暂养2周后的健康斑马鱼随机分为5组,分别置于独立实验缸中进行12 h药物暴露。4个实验组分别配置成25 μg/mL RIF、10 μg/mL OTC、2.0 mg/L $KMnO_4$和0.1 mg/L ClO_2。对照组采用基础养殖水(除不添加药物外,其余操作与暴露组完全一致)。暴露结束后转移至正常养殖水中恢复12 h,随后进行采样。

1.3 斑马鱼皮肤组织采集

使用MS222麻醉鱼,将安乐死的鱼用无菌水冲洗以去除皮肤表面瞬时微生物,放到无菌培养皿中用于皮肤黏液微生物收集。无菌镊子将鱼固定在干净无菌培养皿的适当位置,同时将无菌棉签轻轻地在鱼的两侧滚动,从鳃盖到尾鳍然后再返回,擦拭至斑马鱼体表无黏液[12]。取完微生物的棉签收集于15 mL无菌离心管中,并立即在液氮中冷冻。完成微生物采样后,使用无菌镊子小心剥离斑马鱼皮肤组织并收集在1.5 mL冻存管中并立即在液氮中冷冻,随后和微生物样品一起转移至−80 ℃冰箱保存,直到进行核酸提取分析。

1.4 皮肤微生物16S rRNA高通量测序

本文“材料与方法1.3”中收集的皮肤组织微生物样品的16S rRNA微生物群落扩增子测序,委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。微生物分析在Majorbio Cloud平台上进行[13]。测序读段被分类为操作分类单元(ASV),对ASV代表序列进行分类学分析,获得ASV在分类水平门(phylum)、属(genus)的注释信息。群落多样性中Alpha多样性指标使用Mothur进行指数分析,Beta多样性指标使用软件Qiime计算Beta多样性距离矩阵,然后用R语言作图。使用LEfSe分析组间标志物种的变化。

皮肤组织总RNA使用武汉赛维尔生物科技有限公司的试剂进行提取,其浓度与纯度使用Thermo超微量分光光度计测定。随后,使用翌圣生物科技股份有限公司的反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。qPCR所用引物信息见表1。其中,基因*IL-6*和*Muc2*的引物通过美国国家生物技术信息中心的在线工具设计,并由北京擎科生物科技有限公司合成,其余基因引物序列来自文献[14]。在Bio-Rad公司的CFX Connect TM实时荧光检测系统上进行qPCR反应,程序设置如下:95 ℃预变性2 min,随后进行40个循环的95 ℃变性10 s和60 ℃退火30 s。每个样本设置3个技术重复,基因相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

表1 qRT-PCR引物

Table 1 qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Primer sequences (5′→3′)	产物长度/bp Product length
β-actin	AGGTCATCACCATTGGCAAT GATGTCCACGTCGCACTTCAT	131
IL-1β	CCACGTATGCGTCGCCCAGT GGGCAACAGGCCAGGTACAGG	91
IL-6	TAAATCCGCATGGACTCGCA CGGTCCTCTTGGGGTCTTTC	131
IgM	GAAGCCTCCAATTCTGTTGG CCGGGCTAAACACATGAAG	147
TNF-α	AGAAGGAGAGTTGCCTTTACC-GCT AACACCCTCCATACACCC-GACTTT	81
C3	GCTGTGCACGTCCTTAACAA CATCTCTTCCACCTCCTGCT	100
Muc2	TGCGAGTACAACCTGGTGTC GCAGCGTCACTTTTGCTTCA	178

1.5 统计分析

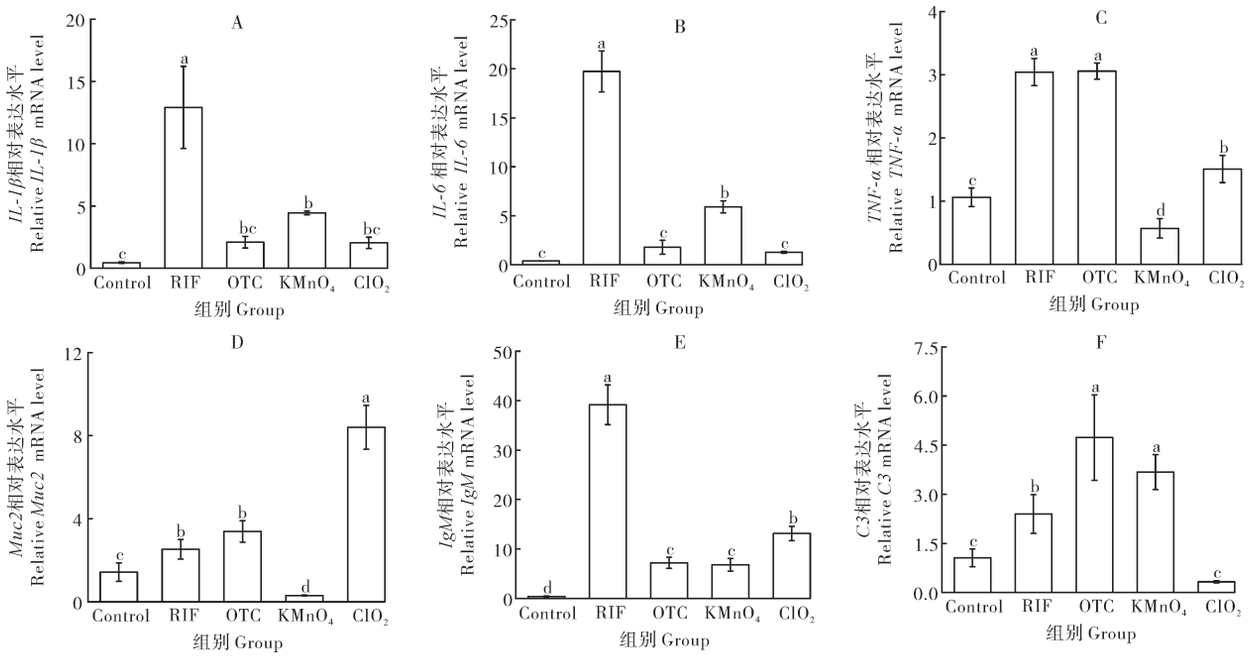
采用SPSS 25.0统计分析软件对试验数据进行ANOVA单因素方差分析、独立样本t检验和方差分析以检验各组之间的差异显著性,当$P<0.05$时,表示差异显著。群落多样性分析基于测序输出文件夹中的数据表,利用Origin 7.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 qRT-PCR检测斑马鱼皮肤组织免疫相关基因的表达

抗生素和消毒剂暴露后,用qRT-PCR检测了斑马鱼皮肤各免疫指标的相对表达量。图1显示,抗生素和消毒剂暴露后,斑马鱼的皮肤组织产生了强烈

的免疫反应。与对照组相比，各暴露组的促炎因子相关基因表达呈现上调趋势。其中RIF组的*IL-1β*、*IL-6*基因mRNA表达量上调均超过10倍，*INF-α*上调也超3倍。$KMnO_4$组的*IL-1β*、*IL-6*基因表达同样显著上调；而OTC组和ClO_2组则主要表现为*TNF-α*基因表达上调（$P<0.05$）。Muc2作为黏液层的主要成分，也在黏膜免疫反应中发挥作用，除$KMnO_4$暴露组外，其他各组*Muc2*基因mRNA表达量均出现显著上调（$P<0.05$），尤其是ClO_2暴露组上调至对照组的6倍。*IgM*作为体液免疫关键免疫因子同样也在斑马鱼皮肤上检测到，与对照组相比，各暴露组表达量显著上调（$P<0.05$）。补体C3是补体系统的关键成分，经抗生素和$KMnO_4$暴露后*C3*表达量也显著上调（$P<0.05$）。



字母不同表示各组之间存在显著性差异（$P<0.05$）；下同。Values with the same letters are not significantly different ($P<0.05$); the same as below.

图1　抗生素和消毒剂暴露后斑马鱼皮肤中各免疫指标基因相对表达量

Fig.1　Relative expression of genes of various immune markers in zebrafish skin after exposure to antibiotics and disinfectants

2.2　抗生素和消毒剂暴露后皮肤菌群多样性分析

稀释曲线如图2所示。稀释曲线末端趋向平坦，说明测序数据量合理，检测结果具有代表性。

分别对5个组的微生物数据进行物种丰富度和多样性分析，根据测序数据绘制Alpha多样性的柱状图（图3），结果显示在抗生素和消毒剂处理后，表征物种丰富度的指数Chao1、表征物种多样性和均匀度的指数Shannon和Ace以及表征物种生态优势度的指数Sobs均显著降低（$P<0.05$）。这意味着外界环境压力改变了斑马鱼皮肤表面原有微生物的组成，皮肤表面稳态发生改变。

Beta多样性分析用来比较2个暴露组与对照组之间皮肤菌群的相似性和差异性。对5个组别间微生物进行主坐标分析（PCoA）和非度量多维尺度（NMDS）分析，结果（图4、图5）显示对照组的样品远离2个暴露组的样品分布，表明抗生素和消毒剂的浸泡改变了斑马鱼皮肤表面的菌群组成。其中图4B、图5B显示不同消毒剂暴露后皮肤菌群聚成3类（$R=0.744\ 9$，$P=0.006$），其中ClO_2暴露组样本与对照组的样本聚集，表明$KMnO_4$暴露对斑马鱼皮肤菌群的影响更大。

2.3　抗生素和消毒剂处理后皮肤菌群组成和结构分析

在斑马鱼皮肤菌群中共检测到35门、100纲、260目、465科、973属，其中在门和属水平上的组成见图6，对照组的健康斑马鱼皮肤表面微生物主要是由变形菌门（Proteobacteria，50.93%）、厚壁菌门（Firmicutes，15.02%）、拟杆菌门（Bacteroidota，14.31%）、放线菌门（Actinomycetota，5.75%）以及绿弯菌门（Chloroflexi，4.26%）组成，它们的丰度占皮肤表面微

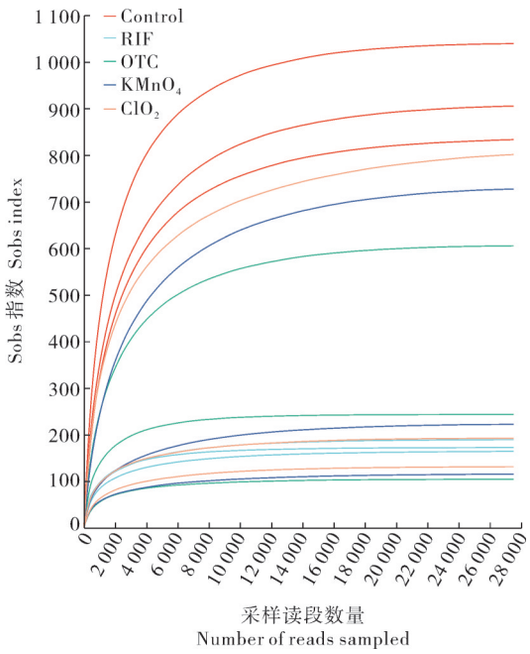


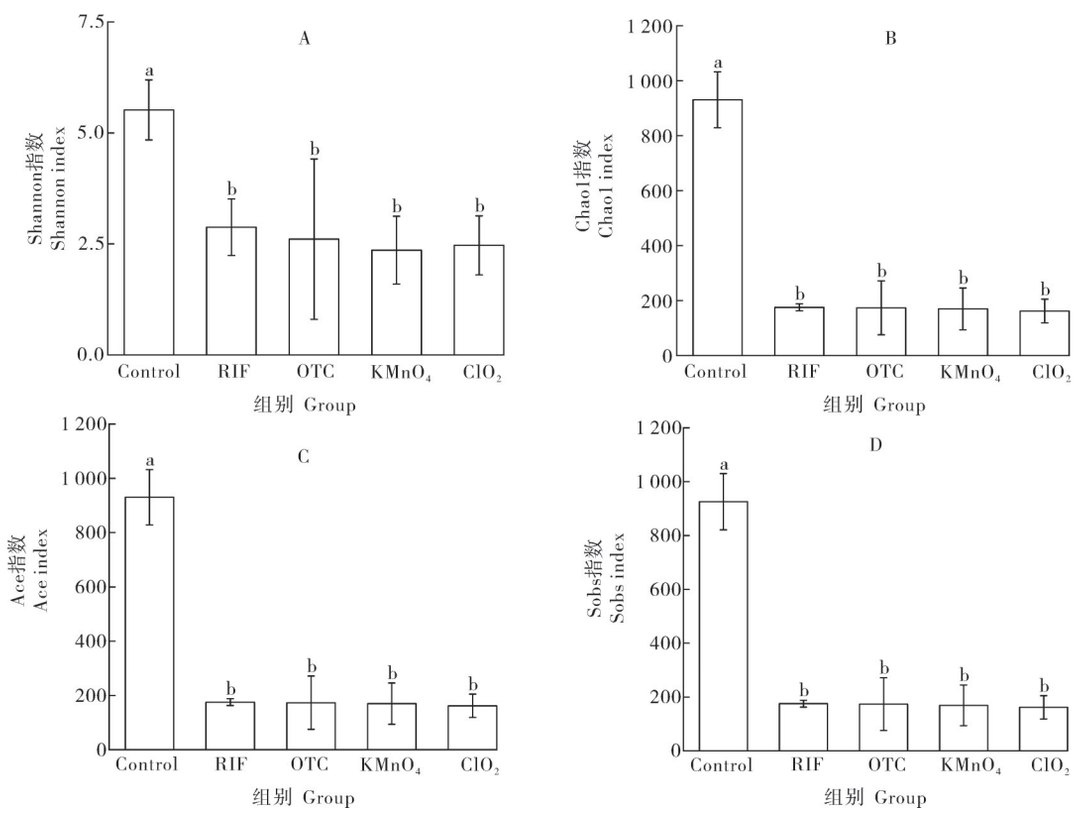
图2 斑马鱼抗生素组、消毒剂组和对照组皮肤微生物样本的稀释曲线

Fig.2 Sparse curves of skin microbial samples from zebrafish antibiotics, disinfectants and control

生物的90.27%，其中变形菌门为最主要的优势菌群。

在门水平上(图6A)，与对照组相比，抗生素和消毒剂暴露后皮肤菌群中变形菌门的相对丰度均有升高，其中RIF组变形菌门相对丰度上升至88.67%，而在对照组中相对丰度较高的其他4类菌相对丰度均降低，梭杆菌门(Fusobacteriota)成为相对丰度第二的菌群(8.58%)。OTC暴露组皮肤菌群门水平变化与RIF暴露组类似，变形菌门相对丰度上升至78.29%，梭杆菌门成为相对丰度第二的菌群(8.42%)。$KMnO_4$暴露组斑马鱼皮肤菌群中相对丰度最大的是变形菌门(87.02%)，其次是绿弯菌门(2.90%)。ClO_2暴露组斑马鱼皮肤菌群中相对丰度最大的是变形菌门(67.90%)，其次是厚壁菌门(11.22%)。

在属水平上(图6B)，在对照组中，相对丰度最大的是栖湖菌属(*Limnohabitans*，10.54%)，其次是假单胞菌属(*Pseudomonas*，4.18%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*，2.68%)。$KMnO_4$暴露组中相对丰度最大的是不动杆菌属(*Acinetobacter*)，相对丰度升高至65.36%，除此以外其他暴露组相对丰度最高的均是栖湖菌属。在抗生素处理的2个组，不动杆菌属



A.Shannon指数；B.Chao1指数；C.Ace指数；D.Sobs指数。A. Shannon index; B. Chao1 index; C. Ace index; D. Sobs index.

图3 Alpha多样性指数组间差异检验

Fig.3 Alpha diversity index was tested for differences between groups

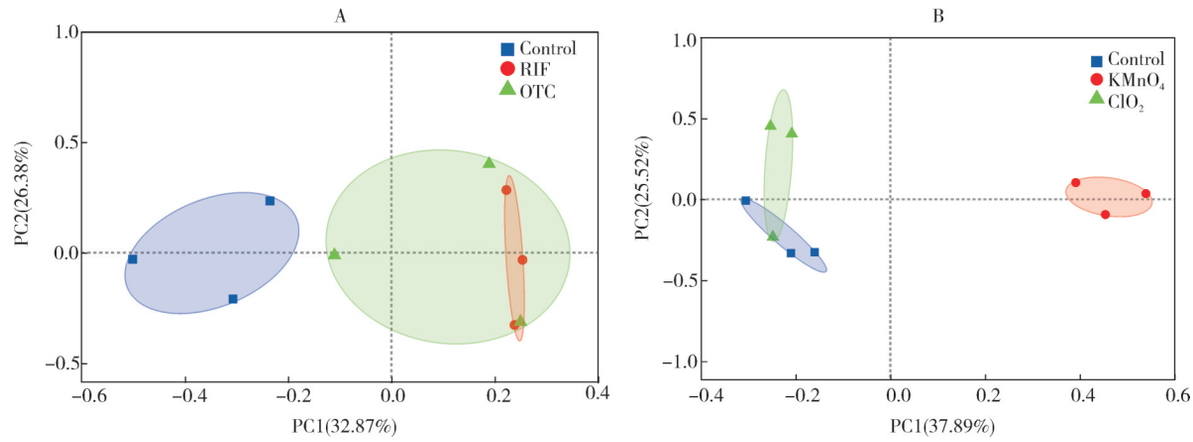


图 4　抗生素（A）、消毒剂（B）暴露组和对照组的主坐标分析（PCoA）

Fig.4　Principal coordinate analysis（PCoA）of the antibiotics（A），disinfectants（B）treatment，and control groups

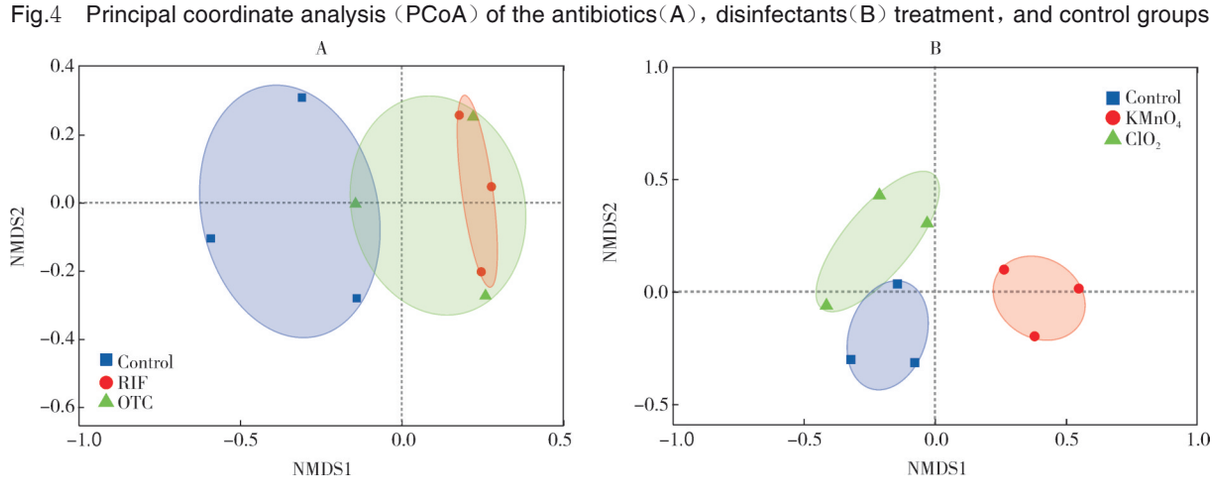
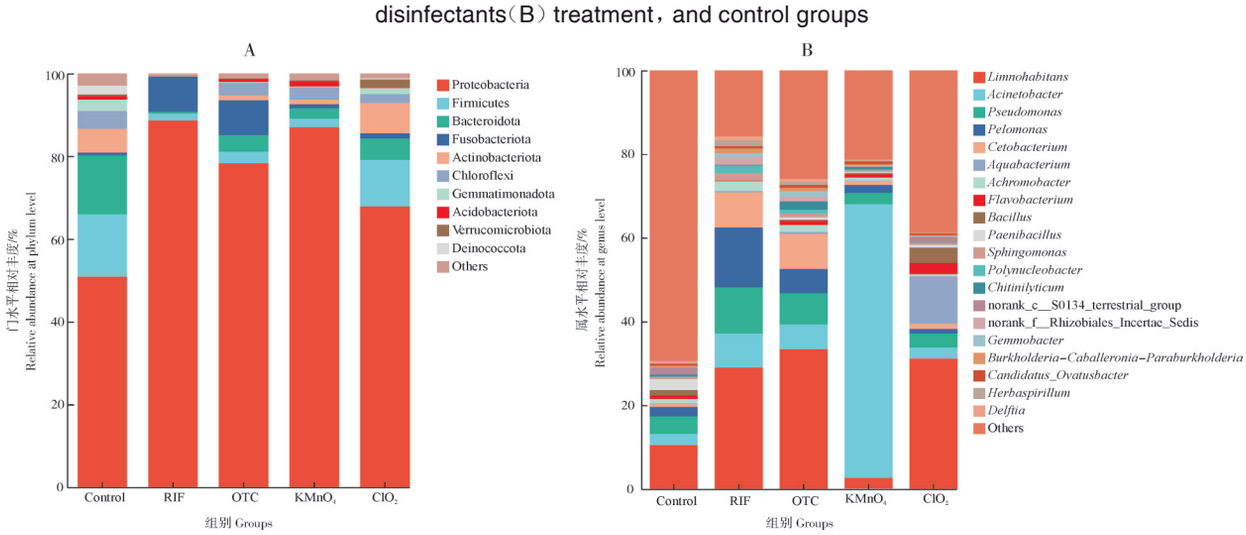


图 5　抗生素（A）、消毒剂（B）暴露组和对照组的非度量多维尺度（NMDS）分析

Fig.5　Non-metric multidimensional scaling（NMDS）analysis of the antibiotics（A），disinfectants（B）treatment，and control groups



A.门水平 Phylum level；B.属水平 Genus level.

图 6　斑马鱼皮肤菌群相对丰度

Fig.6　Relative abundance of zebrafish skin surface microflora

（*Acinetobacter*）、假单胞菌属、泥单胞菌属（*Pelomonas*）和鲸杆菌属（*Cetobacterium*）相对丰度都有升高。ClO_2 暴露组中相对丰度最大的是栖湖菌属（31.20%），其次是水杆状菌属（*Aquabacterium*，

11.30%)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)未被分类属(5.00%)。

从图7物种Venn分析可以看出,RIF、OTC、$KMnO_4$、ClO_2暴露组和对照组的特有ASV数分别为181、364、564、540和1 429,在3 861个ASVs中,5组仅共享58个ASV。这一结果表明抗生素和消毒剂暴露均改变了皮肤的菌群组成。

2.4 抗生素和消毒剂暴露后斑马鱼皮肤菌群标志性差异物种分析

对各暴露组和对照组皮肤菌群进行了LEfSe分析,以确定不同分类水平的差异,结果显示暴露组和对照组皮肤菌群中一共有30个类群丰富度存在显著差异。在对照组的健康鱼皮肤菌群中拟杆菌门、黄杆菌目(Flavobacteriales)、肉杆菌科(Carnobacteriaceae)等菌类富集。在RIF暴露组皮肤菌群中伯克霍尔德氏菌科(Burkholderiaceae)、鞘氨醇单胞菌目(Sphingomonadales)、草酸杆菌科(Oxalobacteracea)等菌类富集。在OTC暴露组皮肤菌群中肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、丝状单胞菌纲(Fimbriimonadales)等菌类富集。$KMnO_4$暴露组标志物种为假单胞菌目(Pseudomonadales),ClO_2暴露组标志物种为鱼孢菌科(Sporichthyaceae)及其中的*Hgcl_clade*属和C39属。

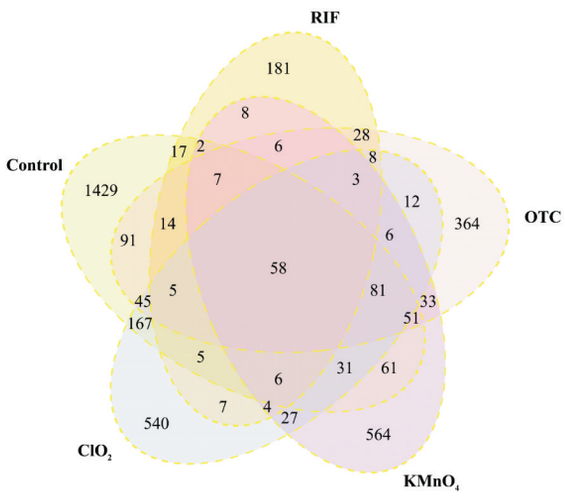
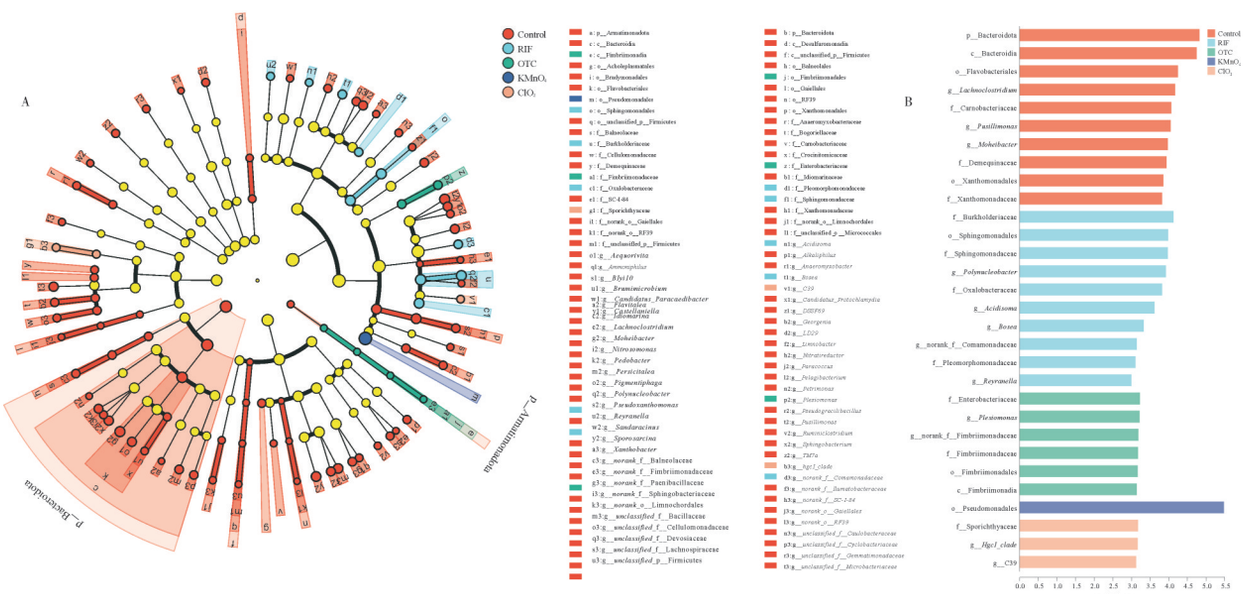


图7 暴露组和对照组物种Venn图分析

Fig.7 Venn diagram analysis of species in the treatment groups and the control group



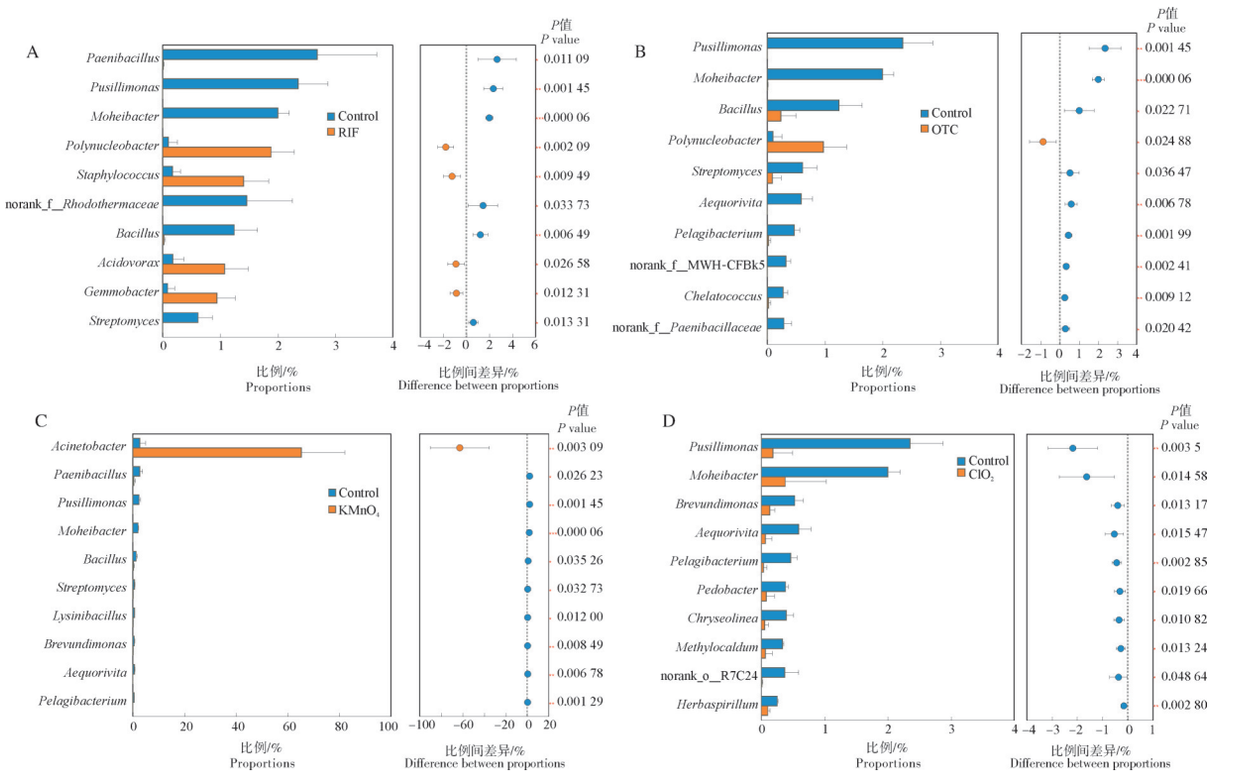
$P<0.05$, LDA>3.

图8 不同药物处理下皮肤菌群LEfSe多级物种层级树图(A)和LDA判别柱形图(B)

Fig.8 LEfSe multi-level species hierarchy tree diagram (A) and LDA discriminant bar chart (B) of skin microbiota under different drug treatments

从图9可以看出,与对照组相比,在相对丰度前10的属中,各暴露组大多数菌相对丰度都显著降低($P<0.05$),其中ClO_2暴露组,相对丰度前10的菌丰度均显著降低($P<0.05$)。RIF暴露组中多核杆菌属(*Polynucleobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、食酸菌属(*Acidovorax*)和芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)相对丰度显著高于对照组($P<0.05$)。OTC暴露组中多核杆菌属相对丰度显著高

于对照组（$P<0.05$）。经 $KMnO_4$ 暴露后，不动杆菌属相对丰度显著升高（$P<0.01$）。以上结果表明，抗生素和消毒剂对斑马鱼皮肤菌群组成的影响存在差异。



A.RIF 组和对照组；B.OTC 组和对照组；C.$KMnO_4$ 组和对照组；D. ClO_2 组和对照组　A. RIF group and control group; B. OTC group and control group; C. $KMnO_4$ group and control group; D. ClO_2 group and control group.

图 9　各暴露组与对照组之间皮肤菌群组成的差异分析（属水平）

Fig.9　Student's t-test bar plot on genus level between treatment groups and control group

3　讨　论

3.1　抗生素和消毒剂暴露影响皮肤免疫水平

通过对斑马鱼皮肤免疫因子相对表达量检测发现，抗生素和消毒剂暴露会诱发斑马鱼皮肤炎症。在鱼类研究中，*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 的表达水平是评估炎症的有效生物标志物[15]，这些细胞因子在炎症、免疫应答、细胞增殖及凋亡等生理过程中发挥着关键作用[15]。斑马鱼皮肤中 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 基因的相对表达量在 RIF 和 OTC 暴露后显著上调，表明抗生素暴露会诱发健康斑马鱼的炎症。这与最近的报道一致[16]，磺胺甲恶唑暴露后会刺激斑马鱼几种炎性细胞因子的表达，包括 *IL-1β*、*IFN-c*、*IL-11*、*IL-6* 和 *TNF-α* 在内的基因表达量上调。Limbu 等[17]发现低环境浓度和合法水产养殖剂量的抗生素会抑制罗非鱼（*Oreochromis niloticus*）肠道和先天免疫并增加炎症，具体表现为肠中的促炎细胞因子如 *IL-1*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 表达量的上调。在本研究中，消毒剂的暴露同样也改变了炎症相关因子的表达量，但这与之前报道的结论不一致。Shi 等[8]使用草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）肠道中免疫相关基因的相对表达来验证消毒剂对免疫系统的影响，与对照组相比，暴露于聚维酮碘和戊二醛 4 周降低了草鱼中肠免疫因子的 mRNA 表达水平，改变了炎症反应。戊二醛组 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-12* 和 *TLR4* 的相对表达显著降低（$P<0.05$），聚维酮碘组 *TNF-α* 和 *IL-1β* 也显著降低（$P<0.05$）。试验结果不一致的原因可能是消毒剂的长期暴露削弱了草鱼的免疫能力。

作为黏膜免疫系统中的一类典型黏蛋白，Muc2 在宿主皮肤的免疫调控中发挥着重要作用。有证据表明[18]，应激后黏液细胞可以调节黏蛋白从基础囊泡分泌到复合胞吐的转变，在短时间内快速产生大量的黏蛋白，短期内 Muc2 分泌的增加有助于重塑黏膜稳态。在本研究中，抗生素和消毒剂的暴露均影响了 *Muc2* 基因的表达，其中 ClO_2 处理后，*Muc2* 基因表达量上调至对照组的 5.8 倍。这与 Wang 等[19]报

道的一致，Wang等[19]使用灭活的迟钝爱德华氏菌（*Edwardsiella tarda*）对牙鲆（*Paralichthys olivaceus*）进行浸泡感染，与对照组相比，在感染结束后的48 h内牙鲆体内*Muc2*基因和蛋白水平均显著上调，并伴有更活跃的黏液细胞增殖和黏液分泌。

补体C3是非特异性体液免疫因子，IgM是体液免疫中的主要调节分子，两者共同组成抵御环境刺激和病原感染防线的一部分。本研究中，抗生素和消毒剂的暴露显著上调了*C3*和*IgM*基因在斑马鱼皮肤上的相对表达量。有研究表明，在小瓜虫（*Ichthyophthirius multifillis*）感染的鱼中，感染后24 h在皮肤中观察到免疫相关基因*IgT*、*IgM*和*IgD*水平显著上调[20]，这表明免疫球蛋白在皮肤感染抗性中的关键功能。

上述结果表明抗生素和消毒剂的暴露可以刺激机体免疫，并可能具有负面作用，例如诱发机体炎症反应。然而，在硬骨鱼中抗生素和消毒剂在多大程度上影响免疫系统，以及抗生素种类、给药时间、剂量、温度、给药途径、生命阶段、性别和年龄等如何影响其作用，目前尚不清楚，后续可进一步研究。

3.2 抗生素和消毒剂暴露导致斑马鱼皮肤菌群紊乱

已有研究证明抗生素和消毒剂的暴露显著降低了微生物群的总数和多样性[21-24]，这与本研究得出的结论（图3）一致。Carlson等[21]表明RIF的使用显著降低了食蚊鱼（*Gambusia affinis*）皮肤菌群总数和多样性。Legrand等[22]发现黄尾鰤（*Seriola lalandi*）在口服联合抗生素（土霉素、红霉素和甲硝唑）后皮肤和肠道微生物群多样性和均匀度均显著下降。此外消毒剂暴露也表现出相同的现象，有研究表明环境浓度的三氯生和苯扎氯铵暴露均扰乱了斑马鱼肠道微生物群，肠道微生物群落的α多样性显著降低[23]。暴露于高锰酸钾显著干扰了鲇（*Silurus asotus*）的皮肤和鳃的微生物群，16S rRNA测序对微生物组的表征证实了高锰酸钾在不同系统发育水平上对皮肤微生物组的破坏，最明显的特征为多样性的丧失[24]。本研究结果显示，与对照组相比，抗生素和消毒剂暴露组斑马鱼皮肤菌群的Shannon等Alpha多样性指数显著降低（图3），同时Beta多样性空间分布呈现明显的群落差异（图4、图5），菌群组成发生特征性改变（图6、图7）。这些发现与已有研究形成证据链，共同表明抗生素和消毒剂暴露可能通过干扰微生物结构，导致斑马鱼皮肤微生态系统失衡。

变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门构成了斑马鱼皮肤微生物群的主要成分。在鱼类皮肤微生物的研究中，变形菌门是硬骨鱼皮肤微生物组中报道的最常见的门[25-27]。然而有研究者认为变形菌门与炎症相关，变形菌门丰度增加可以用作微生物结构紊乱的标志，构成疾病诊断的潜在“微生物特征”[28-29]。该特征在最近一项研究中得到验证，Spilsbury等[30]采用16S rRNA测序探究了摄食亚致死剂量金属的尖吻鲈（*Lates calcarifer*）幼鱼肠道菌群变化，结果显示金属暴露后，变形菌门相对丰度从62%上升至81%，同时实时荧光定量结果表明摄食钒、铁富集饲料的尖吻鲈肠道促炎因子*IL-1*、*IL-10*及*TNF-α*表达量较对照组显著上调，抗炎因子*IL-17*表达量显著下调，由此可见共生菌群组成可能反映了宿主的健康状况。在Carlson等[10]的研究中，食蚊鱼被用作探究RIF对皮肤黏膜微生物组影响的脊椎动物模型，在鱼暴露于RIF后24 h，皮肤菌群中β变形菌纲（Betaproteobacteria）中的伯克霍尔德氏菌属（*Burkholderia*）的相对丰度激增。此外，食蚊鱼会产生抗生素耐药性并且致病菌的易感染性增强。这一结论表明皮肤共生菌群在维持定殖抗性中的关键作用。如图6所示，在门水平上，与对照组相比，各暴露组斑马鱼皮肤中变形菌门相对丰度均升高，同时诱发皮肤炎症，这证实了上述“微生物特征”在硬骨鱼中的潜在诊断价值。此外，各暴露组斑马鱼皮肤菌群多样性和丰富度的降低（图3），极大可能引起宿主患病率增加。

在属水平上，4种处理后不动杆菌属相对丰度都升高了，与对照组相比较，其中$KMnO_4$暴露后，不动杆菌属相对丰度从2.67%上升到65.36%，成为$KMnO_4$暴露组相对丰度最高的属。不动杆菌属于需氧革兰氏阴性菌，广泛分布于土壤、水体、污泥及人体皮肤等多种环境中[31]。该菌属通常被视为条件致病菌，鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*）、鲁氏不动杆菌（*Acinetobacter lwoffii*）、皮特不动杆菌（*Acinetobacter pittii*）及琼氏不动杆菌（*Acinetobacter junii*）现已被证实为鱼类病原菌[32-34]，其感染症状表现为体表充血，腹膜和内脏出血等[35-37]。在最近的一项研究中，Yuan等[38]探究了氨和罗红霉素联合使用对黄颡鱼（*Pelteobagrus fulvidraco*）皮肤黏膜微生物组成的影响，抗生素暴露28 d后黄颡鱼皮肤黏膜微生物群呈现致病菌增加、有益菌减少的变化趋势，其中不动杆菌属对2种抗生素表现出抗性，相对丰度显著上

升。这一变化同样暗示了宿主皮肤表面微生物群的失衡，可能导致机会性病原的入侵。

综上所述，经过12 h的抗生素和消毒剂暴露，斑马鱼皮肤炎症相关基因（*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*）及免疫相关基因（*IgM*、*C3*、*Muc2*）的相对表达量显著上调，表明皮肤免疫屏障功能紊乱；同时，抗生素和消毒剂暴露导致皮肤微生物菌群Alpha多样性显著下降，菌群结构由变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门主导转变为变形菌门占绝对优势，皮肤共生菌群结构发生改变。总之，抗生素和消毒剂暴露会使皮肤稳态受损，进而影响鱼体的健康，因此，水产养殖应尽量减少用药，避免过度用药。

参考文献 References

[1] 王玉堂，赵宏．养殖鱼类疾病的预防措施探析[J]．中国水产，2020(7)：37-40．WANG Y T，ZHAO H．Preventive measures for diseases in farmed fish[J]．Journal of China fisheries，2020(7)：37-40 (in Chinese)．

[2] 宋玲玲．滨州市鲫鱼养殖现状与常见的病害防治[J]．农家参谋，2021(20)：181-182．SONG L L．Current status of crucian carp culture and common disease prevention and control in Binzhou City[J]．Farm staff，2021(20)：181-182 (in Chinese)．

[3] 张大彪，刘长有，马驰，等．渔药对水产养殖品质量安全的影响及对策[J]．江西农业，2019(24)：97，99．ZHANG D B，LIU C Y，MA C，et al．Influence of fishery medicine on the quality and safety of aquaculture products and countermeasures [J]．Journal of Jiangxi agriculture，2019(24)：97，99 (in Chinese)．

[4] MIRANDA C D，GODOY F A，LEE M R．Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms[J/OL]．Frontiers in microbiology，2018，9：1284 [2025-05-14]．https：//doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284．

[5] RICO A，VAN DEN BRINK P J．Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia[J]．Science of the total environment，2014，468/469：630-641．

[6] 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．

[7] ZHOU L，LIMBU S M，SHEN M L，et al．Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health[J]．Environmental pollution，2018，235：245-254．

[8] SHI F，MA L X，CHEN Z L，et al．Long-term disinfectant exposure on intestinal immunity and microbiome variation of grass carp[J/OL]．Aquatic toxicology，2024，272：106942[2025-05-14]．https：//doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106942．

[9] 李小红，付成，付世建．焦虑对雌性成年斑马鱼热耐受和游泳能力的影响[J]．水生生物学报，2024，48(9)：1566-1572．LI X H，FU C，FU S J．Anxiety on thermal tolerance and swimming ability infemale adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]．Acta hydrobiologica sinica，2024，48(9)：1566-1572 (in Chinese with English abstract)．

[10] CARLSON J M，HYDE E R，PETROSINO J F，et al．The host effects of *Gambusia affinis* with an antibiotic-disrupted microbiome[J]．Comparative biochemistry and physiology part C：toxicology & pharmacology，2015，178：163-168．

[11] ALMEIDA A R，TACÃO M，MACHADO A L，et al．Long-term effects of oxytetracycline exposure in zebrafish：a multilevel perspective[J]．Chemosphere，2019，222：333-344．

[12] WAKEMAN W，LONG A，ESTES A M，et al．Zebrafish，*Danio rerio*，skin mucus harbors a distinct bacterial community dominated by Actinobacteria [J]．Zebrafish，2021，18 (6)：354-362．

[13] 祁校羽，徐宏洲，龙静菲，等．全氟辛烷磺酸对斑马鱼肠道形态结构及微生物菌群的影响[J]．水生生物学报，2025，49(4)：50-60．QI X Y，XU H Z，LONG J F，et al．Perfluorooctane sulfonate (PFOS) on intestinal structureand microbiota of zebrafish (*Danio rerio*) [J]．Acta hydrobiologica sinica，2025，49(4)：50-60 (in Chinese with English abstract)．

[14] QIU W H，LIU T，LIU X J，et al．Enrofloxacin induces intestinal microbiota-mediated immunosuppression in zebrafish [J]．Environmental science & technology，2022，56 (12)：8428-8437．

[15] GUO M，LI C H．An overview of cytokine used as adjuvants in fish：current state and future trends[J]．Reviews in aquaculture，2021，13(2)：996-1014．

[16] LIU J Y，WEI T Z，WU X，et al．Early exposure to environmental levels of sulfamethoxazole triggers immune and inflammatory response of healthy zebrafish larvae[J/OL]．Science of the total environment，2020，703：134724 [2025-05-14]．https：//doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134724．

[17] 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．

[18] GUSTAFSSON J K，JOHANSSON M E V．The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis [J]．Nature reviews gastroenterology & hepatology，2022，19(12)：785-803．

[19] WANG J C，GAO J L，SHENG X Z，et al．Teleost Muc2 and Muc5ac：key guardians of mucosal immunity in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J/OL]．International journal of biological macromolecules，2024，277：134127 [2025-05-14]．https：//doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134127．

[20] ZHANG X T，DING L G，YU Y Y，et al．The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthir-*

ius multifillis[J/OL]. Frontiers in immunology, 2018, 9: 2972 [2025-05-14].https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02972.

[21] CARLSON J, LEONARD A, HYDE E, et al.Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad-spectrum antibiotic[J]. Infection and drug resistance, 2017, 10: 143-154.

[22] LEGRAND T P R A, CATALANO S R, WOS-OXLEY M L, et al.Antibiotic-induced alterations and repopulation dynamics of yellowtail kingfish microbiota[J/OL]. Animal microbiome, 2020, 2(1): 26[2025-05-14].https://doi.org/10.1186/s42523-020-00046-4.

[23] MOHAMMED H H, ARIAS C R. Potassium permanganate elicits a shift of the external fish microbiome and increases host susceptibility to columnaris disease [J/OL]. Veterinary research, 2015, 46 (1): 82 [2025-05-14]. https://doi. org/10.1186/s13567-015-0215-y.

[24] LIU Y Y, LIN S Y, WANG C, et al.Sex-specific effects of environmental exposure to the antimicrobial agents benzalkonium chloride and triclosan on the gut microbiota and health of zebrafish (*Danio rerio*)[J].Environmental science & technology, 2024, 58(35): 15450-15462.

[25] AYDIN A, SUDAGIDAN M, MAMATOVA Z, et al.Bacterial skin microbiota of seabass from Aegean fish farms and antibiotic susceptibility of psychrotrophic *Pseudomonas*[J/OL]. Foods, 2023, 12 (10): 1956 [2025-05-14]. https://doi. org/10.3390/foods12101956.

[26] 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.

[27] 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/OL]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 654758 [2025-05-14]. https://doi. org/10.3389/fimmu.2021.654758.

[28] JOHNSON E L, HEAVER S L, WALTERS W A, et al.Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes[J]. Journal of molecular medicine, 2017, 95 (1): 1-8.

[29] RIZZATTI G, LOPETUSO L R, GIBIINO G, et al. Proteobacteria: a common factor in human diseases[J/OL]. BioMed research international, 2017, 2017: 9351507 [2025-05-14]. https://doi.org/10.1155/2017/9351507.

[30] SPILSBURY F, FOYSAL M J, TAY A, et al. Gut microbiome as a potential biomarker in fish: dietary exposure to petroleum hydrocarbons and metals, metabolic functions and cytokine expression in juvenile *Lates calcarifer*[J/OL]. Frontiers in microbiology, 2022, 13: 827371[2025-05-14]. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.827371.

[31] BI B L, YUAN Y, JIA D, et al. Identification and pathogenicity of emerging fish pathogen *Acinetobacter johnsonii* from a disease outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J/OL]. Aquaculture research, 2023, 2023: 1995494 [2025-05-14].https://doi.org/10.1155/2023/1995494.

[32] XIA L, XIONG D M, GU Z M, et al. Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China [J]. Aquaculture, 2008, 284 (1/2/3/4): 285-288.

[33] CAO S Q, GENG Y, YU Z H, et al.*Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax*genus in China[J]. Transboundary and emerging diseases, 2018, 65 (6): 1816-1822.

[34] WANG X, LI J, CAO X J, et al. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China[J].Antonie van leeuwenhoek, 2020, 113(1): 21-32.

[35] MALICK R C, BERA A K, CHOWDHURY H, et al.Identification and pathogenicity study of emerging fish pathogens *Acinetobacter junii* and *Acinetobacter pittii* recovered from a disease outbreak in *Labeo catla* (Hamilton, 1822) and *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) of freshwater wetland in West Bengal, India[J]. Aquaculture research, 2020, 51 (6): 2410-2420.

[36] KUMARAN S, DEIVASIGAMANI B, ALAGAPPAN K M, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KUMS3 from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) with fin rot [J].World journal of microbiology and biotechnology, 2010, 26 (2): 359-363.

[37] MARUDHUPANDI T, KUMAR T T A, PRAKASH S, et al. *Vibrio parahaemolyticus* a causative bacterium for tail rot disease in ornamental fish, *Amphiprion sebae*[J]. Aquaculture reports, 2017, 8: 39-44.

[38] YUAN D H, WANG S D, LI X, et al. Effects of ammonia and roxithromycin exposure on skin mucus microbiota composition and immune response of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J/OL].Fish & shellfish immunology, 2023, 141: 109048 [2025-05-14].https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109048.

Effects of aquatic drugs on skin microbiota and immune response of zebrafish

LIU Shuang[1], XU Juchen[1], LÜ Yabing[1], FAN Yihui[1], HOU Jie[1,2], HE Xugang[1,2]

1.*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*;
2.*Ministry of Education Engineering Research Center for Green Development of Bulk Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt/ Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Aquaculture Facilities Engineering, Wuhan 430070, China*

Abstract　Zebrafish were exposed to 25 μg/mL rifampicin (RIF), 10 μg/mL oxytetracycline (OTC), 2 mg/L potassium permanganate ($KMnO_4$), and 0.1 mg/L chlorine dioxide (ClO_2) for 12 hours to study the potential risks of the widespread use of antibiotics and disinfectants in aquaculture on the skin microbiota and immune responses of fish. Real time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and 16S rRNA high-throughput sequencing were used to detect the immune responses and changes in the skin microbiota in zebrafish. The results showed that the exposure to antibiotics and disinfectants significantly upregulated the expression of inflammation-related genes including interleukin-1β (*IL-1β*), interleukin-6 (*IL-6*), and tumor necrosis factor-α (*TNF-α*) in zebrafish skin compared to the control group ($P<0.05$). The relative expression level of immunoglobulin *IgM*, complement *C3*, and mucin *Muc2* gene was significantly upregulated ($P<0.05$) as well. The Alpha-diversity indices including Chao1, Shannon, Ace, and Sobs of skin microbiota significantly decreased ($P<0.05$). The results of principal coordinates analysis (PCoA) and non-metric multidimensional scaling (NMDS) showed that there was a significant separation in microbial clustering between the control group and the exposure group. Compared to the control group, the relative abundance of *Proteobacteria* increased in all exposed groups, while the relative abundance of *Bacteroidota* and *Firmicutes* decreased. The relative abundance of *Acinetobacter* increased in each exposure group, especially in the $KMnO_4$ treated group where the relative abundance reached as high as 65.36%. It is indicated that the exposure to antibiotics and disinfectants can induce inflammatory reactions and dysbiosis in zebrafish skin, weakening the function of immune barrier in skin and ultimately damaging the health of fish.

Keywords　antibiotics; disinfectants; skin microbiota; inflammation; zebrafish (*Danio rerio*)

(责任编辑:边书京)