

DOI: 10.15886/j.cnki.hdxzbk.2024031201

CSTR: 32403.14.hndk.2024031201

海洋牧场与现代渔业



引用格式: 王佳文, 关博元, 蔡岩, 等. 不同季节甲醛消毒对罗非鱼鱼卵菌群的影响 [J]. 海南大学学报(自然科学版中英文), 2025, 43(1): 15-24.

Citation: WANG Jiawen, GUAN Boyuan, CAI Yan, et al. Effects of formaldehyde disinfection on the surface symbiotic microbiota of tilapia eggs in different seasons[J]. Natural Science of Hainan University, 2025, 43(1): 15-24.

不同季节甲醛消毒对罗非鱼鱼卵菌群的影响

王佳文^{1,2}, 关博元^{1,2}, 蔡岩^{1,2}, 李美静^{1,2}, 赵章定³, 王世锋^{1,2*}

(1. 海南大学 海洋生物与水产学学院, 海南 海口 570228;

2. 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228;

3. 海南宝路水产科技有限公司, 海南 海口 571822)

摘要: 为研究罗非鱼人工孵化流程中甲醛消毒对鱼卵表面共生菌群的影响, 利用 16S rRNA 高通量测序技术对罗非鱼亲鱼塘未消毒鱼卵(消毒前鱼卵, EP)以及经甲醛消毒后放入孵化系统第 2 d 的鱼卵(消毒后鱼卵, E2)的表面共生菌群进行分析和功能预测。结果显示, 在春季、秋季和冬季, EP 鱼卵 OTU 数目高于 E2 鱼卵, EP 鱼卵 Ace、Chao1 指数显著高于 E2 鱼卵 ($P < 0.05$), EP 鱼卵 Simpson 指数则显著低于 E2 鱼卵 ($P < 0.05$); 消毒前后微生物群落结构 PcoA 分析显示 4 个季节均存在显著性差异 ($P < 0.05$); 在门水平上, E2 鱼卵上拟杆菌门丰度比 EP 鱼卵增加, 在秋季更显著 ($P < 0.05$); 在属水平上, E2 鱼卵上鲸杆菌属、芽孢杆菌属和弧菌属丰度显著低于 EP 鱼卵 ($P < 0.05$), 而黄杆菌属、假单胞菌属和金黄杆菌属丰度显著增加 ($P < 0.05$)。菌群功能预测表明, 氨基酸转运和新陈代谢、无机离子运输和代谢、碳水化合物运输和代谢为主要的预测功能。以上结果表明, 罗非鱼鱼卵经甲醛消毒转移至室内孵化系统 2 d 后, 其表面共生菌群结构发生显著变化且物种多样性显著降低; 潜在益生菌丰度降低, 潜在致病菌丰度升高; 微生物功能特征无显著差异。

关键词: 罗非鱼鱼卵; 消毒; 孵化系统; 16S rRNA; 微生物群落组成

中图分类号: S949

文献标志码: A

文章编号: 1004-1729(2025)01-0015-10

Effects of formaldehyde disinfection on the surface symbiotic microbiota of tilapia eggs in different seasons

WANG Jiawen^{1,2}, GUAN Boyuan^{1,2}, CAI Yan^{1,2}, LI Meijing^{1,2}, ZHAO Zhangding³, WANG Shifeng^{1,2*}

(1. School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology of Hainan Province, Haikou 570228, China;

3. Hainan Baolu Aquatic Products Technology Co., Ltd, Haikou 571822, China)

Abstract: In order to investigate the effects of formaldehyde disinfection on the symbiotic bacterial community on the surface of the tilapia eggs during artificial incubation, in the report, 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to analyze and predict the surface symbiotic bacterial community of the unsterilized tilapia eggs (pre disinfection eggs, EP) collected from tilapia parent fish pond and the eggs (post disinfection eggs, E2) placed in the incubation system on the second day after formaldehyde disinfection. The

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 海南省重点研发项目 (ZDYF2021XDNY276); 横向项目 (HD-KYH-2022002)

作者简介: 王佳文 (1999—), 男, 山东威海人, 海南大学水产专业 2021 级硕士研究生, E-mail: wangjiawen9599@163.com

通信作者: 王世锋 (1977—), 男, 河北任丘人, 教授, 博士, 研究方向: 水产动物健康养殖与疾病控制, E-mail: Shifeng_15@163.com

results indicated that during spring, autumn, and winter, the number of OTUs in EP fish eggs were higher than that in E2 fish eggs, and the Ace and Chao1 indices of EP fish eggs were significantly higher than those of E2 fish eggs ($P<0.05$), the Simpson index of EP fish eggs were significantly lower than that of E2 fish eggs ($P<0.05$). The PcoA analysis results indicated that before and after disinfection, there were significant differences between the microbial community structure in all four seasons ($P<0.05$). At the phylum level, compared to EP fish eggs, the abundance of *Bacteroidetes* on E2 fish eggs increased, and which was more significant in autumn ($P<0.05$). At the genus level, the abundance of *Cetobacterium*, *Bacillus*, and *Vibrio* genera on E2 fish eggs were significantly lower than that on EP fish eggs ($P<0.05$), while the abundance of *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Chryseobacterium* significantly increased ($P<0.05$). The prediction of microbial community functions showed that amino acid transport and metabolism, inorganic ion transport and metabolism, and carbohydrate transport, and metabolism were the main predictive functions. After being disinfected with formaldehyde and transferred to an indoor incubation system for 2 days, the surface symbiotic bacterial community structure of tilapia eggs underwent significant changes and the species diversity significantly decreased. The abundance of potential probiotics decreased. There were no significant differences in the microbial functional characteristics. Our finding provided the theory guidance and the basis for disease prevention and control in the artificial hatching system of tilapia eggs.

Keywords: tilapia eggs; disinfection; incubation system; 16S rRNA; microbial community composition

0 引言

罗非鱼(*Tilapia*)属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲈形目(Perciformes), 鲈形亚目(Percoidei), 鲷鱼科(Cichidae), 罗非鱼属(*Oreochromis*), 主要分布于热带和亚热带地区, 能够耐受低氧环境, 具有广盐性和杂食性等特点, 生存温度为 $15 \sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[1]。罗非鱼深受消费者喜爱, 市场认可度高, 罗非鱼养殖业也成为联合国粮农组织认可的重要产业^[2]。但在当前, 罗非鱼苗生产存在季节性差异, 尚未实现稳定的全年可控供应, 这主要是由于罗非鱼生殖力低、产卵周期不同步和病害等原因, 导致鱼卵人工孵化率低, 这也成为罗非鱼商业化生产的最重要制约因素之一^[3]。鱼卵产出后就暴露在周围的微生物环境中^[4], 环境中的微生物即在鱼卵上进行定殖, 在鱼卵表面形成共生微生物群落, 稳定的微生物群落也通过占位、竞争营养以及产生针对特定病原菌的抗菌化合物等方式保护鱼卵免受病原体的侵袭^[5]。

通过消毒控制致病微生物丰度, 维持鱼卵菌群稳定在鱼卵人工孵化生产中具有重要作用。苗种生产单位对孵化设备、孵化管理方法进行研究显示, 罗非鱼卵孵化系统应该保证孵化水体具有较低的微生物和有机质负荷, 维持鱼卵在孵化桶内的悬浮状态并提供充足的溶氧^[6]。为了满足这些要求, 苗种生产单位广泛使用人工孵化系统, 并且普遍采取消毒的方式调控鱼卵和孵化系统内的微生物, 以降低致病微生物的影响^[7]。常用的消毒方法包括化学消毒剂消毒、臭氧消毒和抗生素消毒等, 这些消毒措施对于控制疾病和提高孵化成功率至关重要, 但干扰和破坏鱼卵共生微生物群落^[8], 降低微生物群落多样性并改变微生物群落结构, 影响胚胎发育^[9]。

近年来, 鱼卵表面微生物组成研究备受关注意^[10]。罗非鱼卵在自然条件下孵化需要 $5 \sim 7 \text{ d}$, 维持其表面适宜共生菌群的稳定, 可起到保障罗非鱼卵孵化率的作用。然而, 罗非鱼卵从亲鱼塘采集后经甲醛消毒转移到室内孵化系统, 其表面共生菌群变化研究鲜有报道。基于细菌 16S rRNA 的高通量测序能够全面、高效地反映细菌群落的组成和多样性, 已被广泛应用于鱼类共生菌群的研究中^[11-13]。因此, 本文采用 16S rRNA 高通量测序技术研究 4 个季节尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼卵从亲鱼塘采集后经甲醛消毒转入室内孵化系统后, 鱼卵表面共生菌群的变化并进行鱼卵菌群的功能预测, 为罗非鱼卵生产孵化流程中细菌病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存 分别于 2020 年 12 月(冬季)、2021 年 3 月(春季)、2021 年 7 月(夏季)和 2021 年 10 月(秋季)在海南宝路水产有限公司进行取样。取样共分为 8 组,分别为从亲鱼塘采集的未消毒鱼卵(消毒前鱼卵, EP 鱼卵),包括春季消毒前鱼卵(SP_EP)、夏季消毒前鱼卵(SU_EP)、秋季消毒前鱼卵(A_EP)和冬季消毒前鱼卵(W_EP)共 4 组;经质量分数为 1×10^{-4} 的甲醛(AR)消毒处理后转入至室内孵化系统 2 d 后的鱼卵样品(消毒后鱼卵, E2 鱼卵),包括春季消毒后鱼卵(SP_E2)、夏季消毒后鱼卵(SU_E2)、秋季消毒后鱼卵(A_E2)和冬季消毒后鱼卵(W_E2)共 4 组。每组样品从 5 口亲鱼塘及对应孵化系统中分别取样,即 5 个重复。鱼卵取样方法参照 Fariedah 等人^[14]的报道。各样本使用高温灭菌后的 PBS 缓冲溶液(8 g NaCl, AR; 0.2 g KCl, AR; 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, AR; 0.24 g KH_2PO_4 , AR; 1 L H_2O)冲洗 3 次,冲洗后的鱼卵样品置于无菌离心管中。将所有离心管投入液氮速冻 3 d,然后转移到 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱用于 16S rRNA 高通量测序。

1.2 总 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序 使用 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit 进行总 DNA 提取,利用 NanoDrop2000 检测 DNA 纯度和浓度,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。16S rRNA 基因的高通量测序是使用 V3 ~ V4 区域细菌通用引物进行 PCR 扩增而形成的,上游引物为 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),下游引物为 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[15]。PCR 扩增条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min,95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,53 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,循环 30 次,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经回收、纯化等处理后送至上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序。

1.3 数据处理与分析 使用 QIIME(version 1.9.1)对获得的原始序列进行过滤和分析,并在相似性 $\geq 97\%$ 的分类标准下(默认为物种水平的相似性)对高质量序列进行操作分类单元(OTU)分类^[16]。在 97% 相似水平下使用 Uparse(version 11.0)^[17]对有效序列进行 OTU 聚类,生成 OTU 表格。然后利用 RDP Classifier(version 2.13)^[18]对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,与 Silva(version 11.5)等细菌 16S 序列数据库进行比对,得到各级分类学水平的物种注释信息。基于 OTU 水平绘制稀释曲线和物种 Venn 图。 α 多样性分析选取群落多样性(Shannon 指数和 Simpson 指数)和群落丰富度(Chao1 指数和 Ace 指数)共 4 种指数,基于 OTU 水平分别对 4 个季节的消毒前鱼卵与消毒后鱼卵样品采用 Student's T 双尾检验,由 Mothur(version 1.30.2)^[19]计算。 β 多样性采用主坐标分析(PcoA),使用 Qiime 创建的 Bray-Curtis 距离进行评估,由 R 语言绘制(version 3.3.1)。分别基于门水平和属水平上利用 R 语言工具绘制群落物种组成柱状图(物种丰度 $< 5\%$ 归类为 others)。使用 Kruskal-Wallis 秩和检验分别在门水平和属水平上对 4 个季节消毒前和消毒后鱼卵样品进行组间差异显著性检验。使用 PICRUST1 对消毒前与消毒后的鱼卵菌群进行功能预测。

2 结果

2.1 消毒前后鱼卵样品菌群物种注释与评估 所采集的 40 个鱼卵样品中,37 个样品成功提取 DNA 序列并完成 PCR 扩增。在 97% 的相似性水平下,37 个样品共得到 1 109 334 个有效序列,5 273 个 OTUs。在物种分类水平上,所有 OTUs 经物种注释分配至 59 个门,172 个纲,405 个目,707 个科,1 489 个属。

2.2 消毒前后鱼卵样品菌群物种组成 鱼卵样品菌群物种 Venn 图显示,在春季(图 1a),SP_EP 样品独有 1 823 个 OTUs,SP_E2 样品独有 98 个 OTUs,共有 197 个 OTUs;在夏季(图 1b),SU_EP 样品独有 842 个 OTUs,SU_E2 样品独有 969 个 OTUs,共有 541 个 OTUs;在秋季(图 1c),A_EP 样品独有 2 647 个 OTUs,A_E2 样品独有 55 个 OTUs,共有 120 个 OTUs;在冬季(图 1d),W_EP 样品独有 1 535 个 OTUs,W_E2 样品独有 126 个 OTUs,共有 182 个 OTUs。以上结果表明,在春季、秋季和冬季,消毒前鱼卵 OTU 数目高于消毒后鱼卵,而在夏季,消毒前鱼卵 OTU 数目低于消毒后鱼卵。

2.3 消毒前后鱼卵样品菌群组成分析 样品菌群组成分析结果显示,在门水平上(图 2a),消毒前鱼卵与消毒后鱼卵菌群均以变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门。与消毒前鱼卵相比,消毒后鱼卵菌群中变形

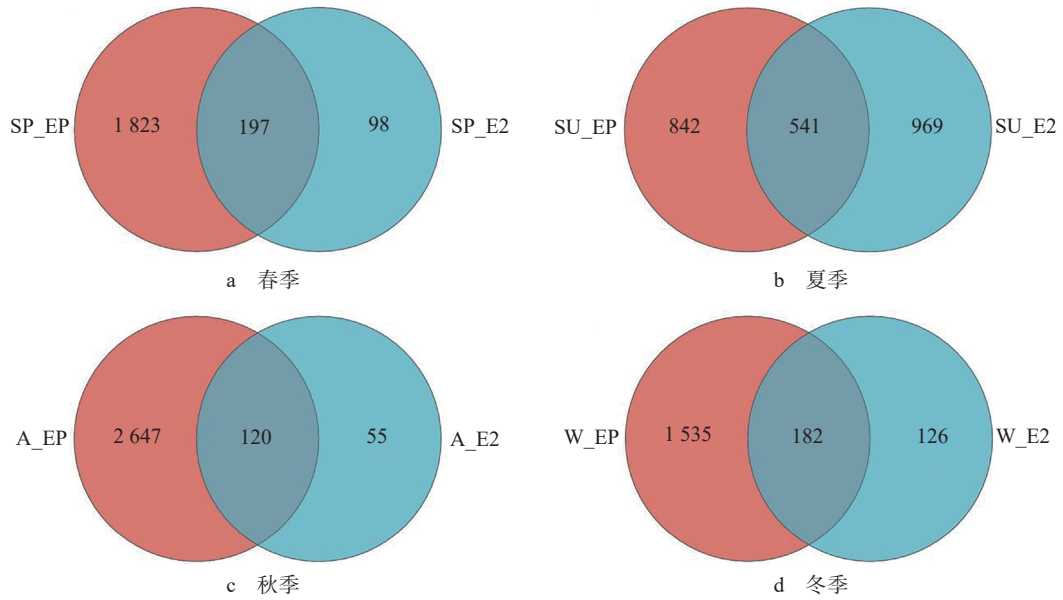


图 1 4 个季节罗非鱼鱼卵样品菌群物种 venn 图

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

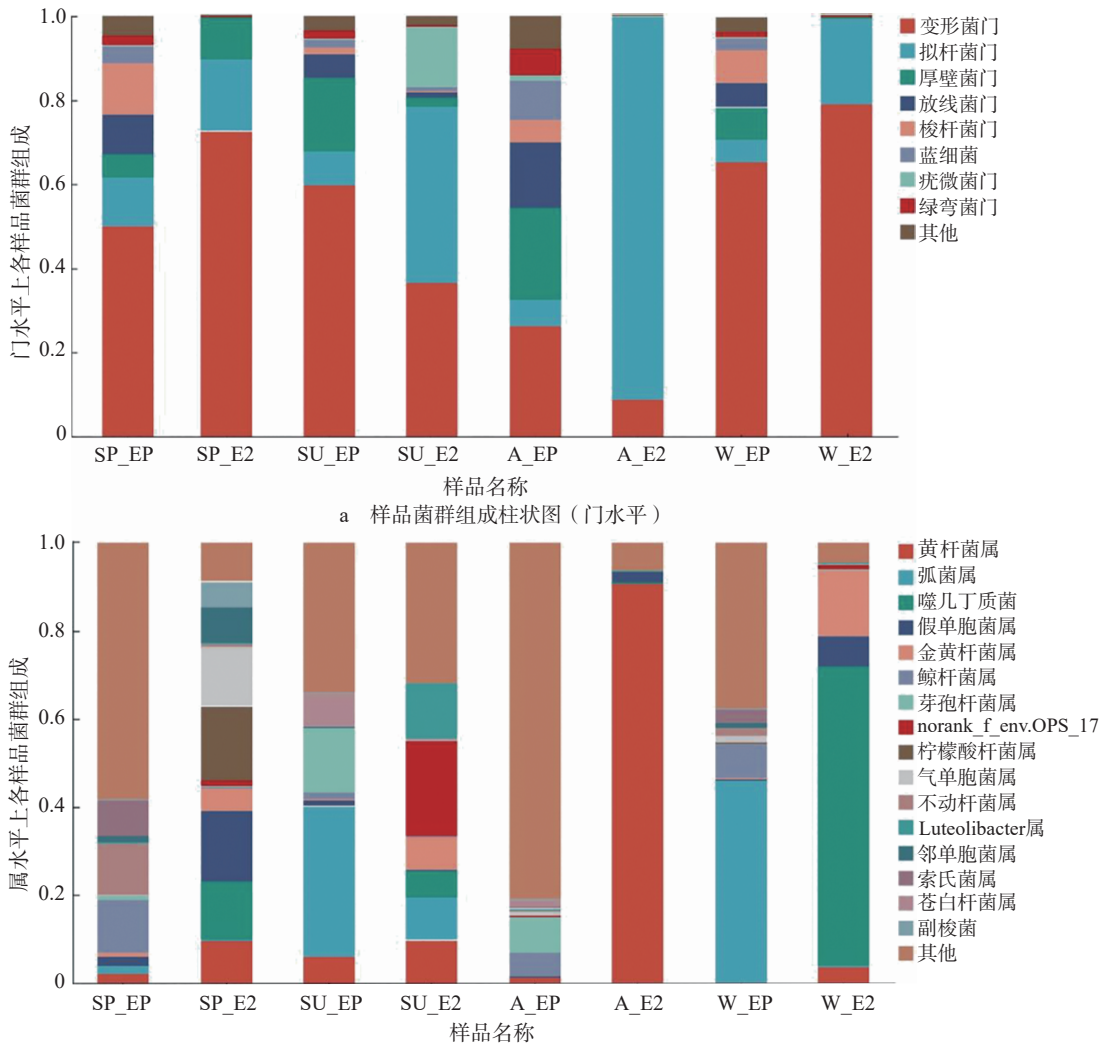


图 2 鱼卵样品菌群组成柱状图

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

菌门在春季和冬季丰度增加,而在夏季和秋季其丰度降低;拟杆菌门(Bacteroidota)在 4 个季节丰度均增加,且在秋季其丰度增加最显著,丰度达到 91.06%;厚壁菌门(Firmicutes)在春季丰度增加,而在夏季、秋季和冬季丰度降低;放线菌门(Actinobacteriota)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、蓝细菌(Cyanobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)丰度均降低。

在属水平上(图 2b),消毒后鱼卵菌群相比于消毒前鱼卵菌群,黄杆菌属(*Flavobacterium*)丰度均增加,且在秋季增加更显著,丰度达到最大值 90.99%;假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度在春季、秋季和冬季增加;金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)丰度在春季、夏季和冬季增加;鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)丰度在 4 个季节中均降低;弧菌属(*Vibrio*)丰度在春季、夏季和冬季均降低。

2.4 消毒前后鱼卵样品菌群多样性分析

2.4.1 α -多样性 消毒前鱼卵和消毒后鱼卵样品菌群 α 多样性结果如表 1 所示。在春季、秋季和冬季,消毒前鱼卵 Ace、Chao1 指数均显著高于消毒后鱼卵($P < 0.05$),其中在春季和秋季,消毒前鱼卵 Shannon 指数显著高于消毒后鱼卵($P < 0.05$),Simpson 指数显著低于消毒后鱼卵($P < 0.05$)。在夏季,消毒前与消毒后鱼卵样品中各指数之间无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 4 个季节中消毒前与消毒后鱼卵样本 alpha 多样性表(*: $P < 0.05$)

季节	组别	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao1 指数
春季	SP_EP	4.30±0.48*	0.07±0.04	834.78±273.44*	846.65±272.64*
	SP_E2	1.54±0.48	0.36±0.12*	177.75±107.55	150.65±89.51
夏季	SU_EP	2.53±2.33	0.35±0.36	550.99±338.56	547.70±355.16
	SU_E2	2.85±0.64	0.16±0.06	584.43±324.29	592.21±334.37
秋季	A_EP	5.21±0.92*	0.02±0.03	1 346.1±434.23*	1 360.20±437.05*
	A_E2	0.46±0.07	0.82±0.03*	212.41±132.35	138.45±69.42
冬季	W_EP	2.71±2.49	0.44±0.46	611.24±393.42*	615.33±397.37*
	W_E2	1.09±0.55	0.54±0.21	172.16±57.84	153.42±59.71

2.4.2 β -多样性 β 多样性结果显示,春季(图 3a)消毒前与消毒后鱼卵在 PcoA 图中 PC1 解释了细菌群落总变异的 25.81%,PC2 解释了细菌群落总变异的 20.39%($R=0.818 8, P=0.009$);夏季(图 3b)消毒前与消毒后鱼卵在 PcoA 图中 PC1 解释了细菌群落总变异的 31.81%,PC2 解释了细菌群落总变异的 22.6%($R=0.643 7, P=0.008$);秋季(图 3c)消毒前与消毒后鱼卵在 PcoA 图中 PC1 解释了细菌群落总变异的 73.47%,PC2 解释了细菌群落总变异的 14.35%($R=1.000, P=0.009$);冬季(图 3d)消毒前与消毒后鱼卵在 PcoA 图中 PC1 解释了细菌群落总变异的 51.07%,PC2 解释了细菌群落总变异的 24.86%($R=0.987 5, P=0.010$)。综上,4 个季节消毒前与消毒后鱼卵表面共生菌群群落组间均具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 消毒前后鱼卵样品菌群差异分析 样品菌群差异分析结果显示,门水平上(图 4),在秋季,消毒前与消毒后鱼卵菌群中变形菌门丰富度最低;在 4 个季节中,消毒后鱼卵菌群中拟杆菌门丰富度均显著高于消毒前鱼卵($P < 0.05$),且在秋季消毒后鱼卵菌群中其丰富度最高。属水平上(图 5),在 4 个季节中,消毒后鱼卵菌群中黄杆菌丰度均显著高于消毒前鱼卵($P < 0.05$),且在秋季消毒后鱼卵菌群中其丰富度最高;除秋季鱼卵样品外,在春季、夏季和冬季,消毒后鱼卵菌群中金黄杆菌属丰富度均增加,而弧菌属丰富度均降低;在 4 个季节中,鲸杆菌和芽孢杆菌丰富度在消毒后鱼卵菌群中均降低。

2.6 消毒前后鱼卵样品菌群功能预测分析 PICRUST1 结果显示(图 6),消毒前后鱼卵菌群功能变化较小,差异不显著。氨基酸转运和新陈代谢是消毒前与消毒后罗非鱼鱼卵菌群中主要的预测功能之一,平均丰度分布在 8.28%~10.45%,为相对丰度占比最高的预测功能。其次,碳水化合物运输和代谢功能平均丰度分布在 4.03%~6.10%,无机离子运输和代谢功能平均丰度分布在 6.14%~7.50%。

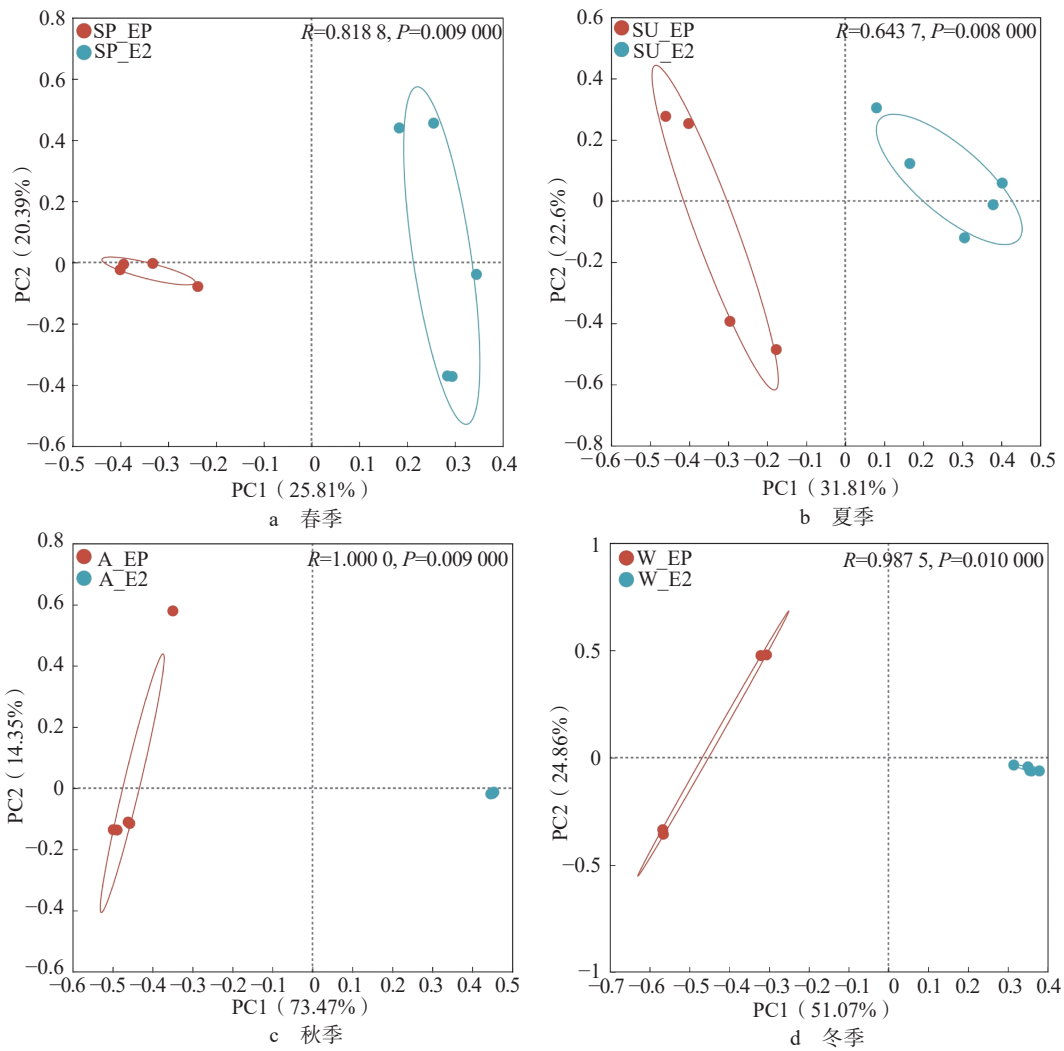


图3 4个季节鱼卵样品菌群多样性 PcoA 图

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

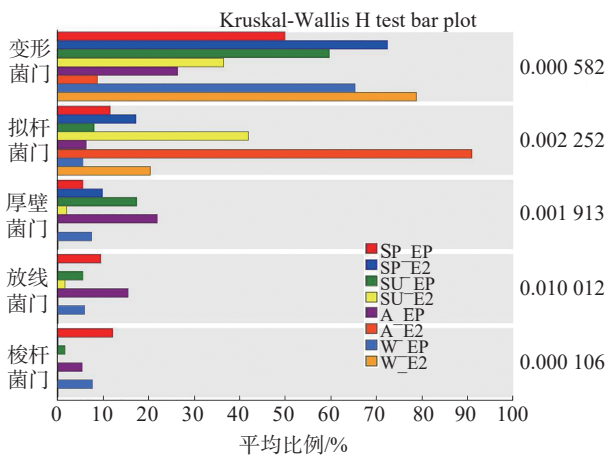


图4 门水平上鱼卵样品组间显著性差异检验

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

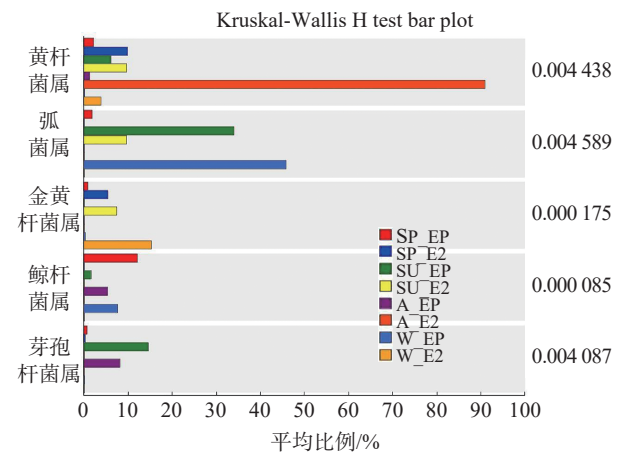


图5 属水平上鱼卵样品组间显著性差异检验

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

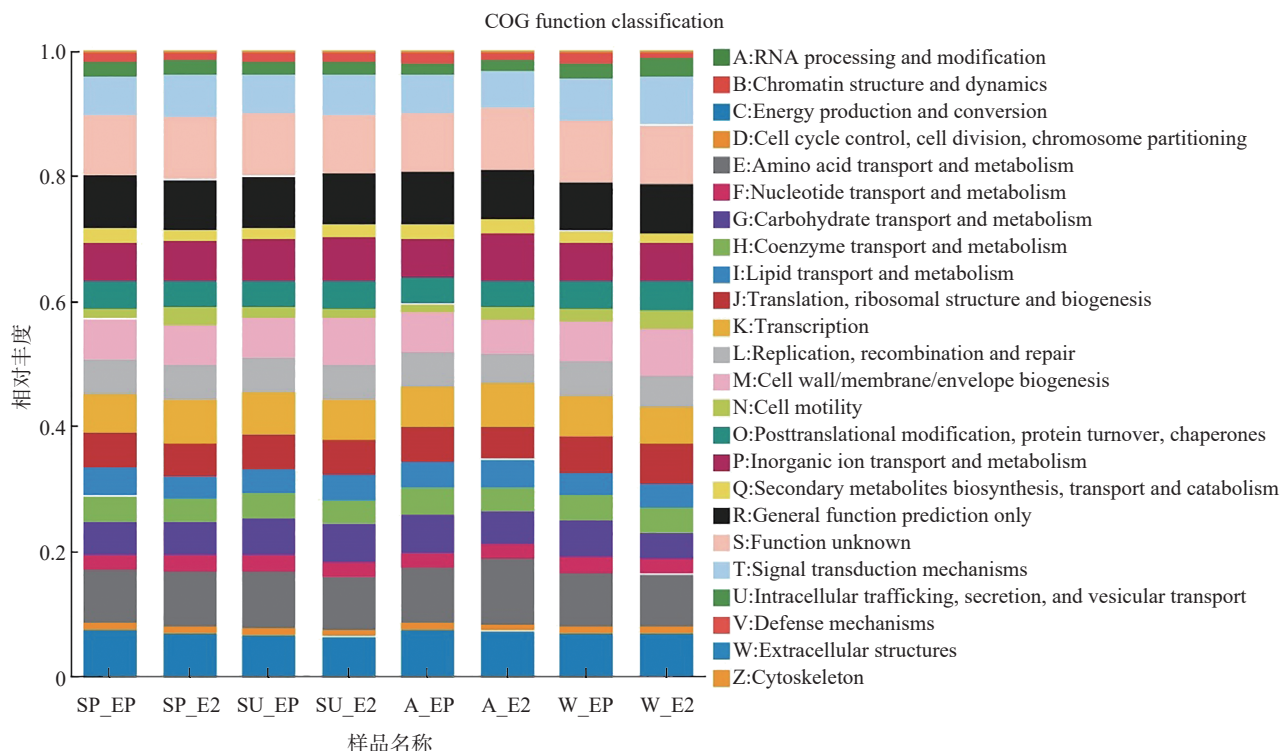


图 6 鱼卵样品菌群功能预测

注: SP-春季, SU-夏季, A-秋季, W-冬季; EP-消毒前鱼卵, E2-消毒后鱼卵。

3 讨 论

共生菌群在宿主个体发育和健康中扮演着重要角色^[20],当前绝大多数研究主要集中在水生动物体表及肠道菌群方面,对水产动物受精卵上的菌群研究鲜有报道。在人工孵育条件下,鱼卵上微生物群中条件致病菌所占比例过高,会阻碍卵的发育和孵化^[21]。通过消毒处理降低鱼卵受到条件致病菌的感染,提高孵化率,是目前孵化场最重要的常规工作^[7-9]。消毒处理可显著降低受精卵上可培养细菌的数量。如 Lahnsteiner^[8]发现氯胺-T、碘伏等消毒剂可以显著降低褐鳟(*Salmo trutta*)鱼卵表面可培养细菌的数量。Bone 等人^[22]发现福尔马林消毒会降低贝氏隆头鱼(*Labrus bergylta*)鱼卵表面细菌的丰度。Maapea 等人^[23]研究发现,氯胺-T、过氧化氢、甲醛等 4 种消毒剂可以显著降低海参(*Argyrosomus japonicus*)受精卵上可培养细菌的数量。消毒剂处理可改变水生动物体表共生菌群结构,如 Zhang 等人^[24]发现,聚维酮碘消毒可以降低锦鲤(*Cyprinus carpio*)鳃上细菌的丰富度,并降低多样性。在本研究中,在春季、秋季和冬季,罗非鱼卵消毒后放入孵化系统第 2 d 的表面共生菌群中 OTU 数目低于消毒前鱼卵,消毒后鱼卵菌群多样性及物种丰富度均显著低于消毒前鱼卵表面共生菌群, β 多样性结果也显示,经消毒转移至室内孵化系统 2 d 后,罗非消毒后鱼卵表面的共生菌群结构发生显著改变。不过, Najafpour 等^[25]发现欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)和海鲷(*Sparus aurata*)鱼卵经碘伏消毒前后菌群多样性和丰富度均无显著性差异,其认为可能是由于所采用的消毒方案效果不够,或 16S rRNA 高通量测序所扩增的序列既可来自于活菌,也可以来自于死菌。消毒处理可以改变微生物群落结构^[26],但鱼卵在孵化期间表面共生菌群的变化未曾见有报道。稳定的菌群结构对于维持鱼体健康起重要作用^[27-28],未来可从调整消毒方法、优化消毒时间或改变孵化条件等手段以维持更稳定的鱼卵菌群结构,同时有必要研究鱼卵表面共生菌群随孵化时间的增加而发生的变化。

从物种组成上看,门水平上,已有的研究表明变形菌门是淡水鱼类肠道菌群中的优势菌门^[29],在本研究中发现罗非鱼鱼卵菌群中变形菌门为主要优势菌门,与 Maapea 等人^[23]的研究结果一致,他们证实日本黄姑鱼(*Argyrosomus japonicus*)鱼卵菌群中变形菌门为优势菌门。属水平上,许多细菌已经被证明能够在鱼卵表面定殖,包括一些鱼类病原体,如黄杆菌、假单胞菌、气单胞菌(*Aeromonas sp.*)^[21]和弧菌^[22]。从亲

鱼塘采集的消毒前鱼卵菌群中,发现了一些对罗非鱼共生菌群至关重要的菌属,如不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鲸杆菌属、芽孢杆菌属等^[30-32]。然而,在消毒后鱼卵菌群中,这些有益菌属的丰度有所降低,相反,黄杆菌属^[33]、假单胞菌属^[34]、柠檬酸细菌属(*Citrobacter*)^[35]、气单胞菌属^[36]、金黄杆菌属^[37]等可能含有致病菌的菌属丰度提高。

消毒可能会破坏微生物群落的平衡,使机会性细菌繁殖^[38]。从不同季节上看,在秋季消毒后鱼卵表面共生菌群中,黄杆菌丰度显著增加至90.99%,本实验室前期研究发现柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)在秋季引起罗非鱼卵疾病大规模暴发^[39],Cipriano等人^[40]发现嗜冷黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)能够感染大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)鱼卵,因此要谨防秋季罗非鱼卵柱状黄杆菌病暴发;在春季、夏季和冬季消毒后鱼卵表面共生菌群中,金黄杆菌丰度增加;在春季、秋季和冬季消毒后鱼卵表面共生菌群中,假单胞菌丰度增加。目前尚无研究报告金黄杆菌属和假单胞菌属在鱼卵中致病的案例,但鉴于水产鱼卵病害研究的稀缺,这并不意味着这些细菌对鱼卵无害,已有文献记载金黄杆菌属中的*Chryseobacter balustinum*是从患病虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)中分离出来的,它与患病鱼的病理状况有关^[37]。未来应针对这些细菌在鱼卵孵化过程中的致病风险进行研究。

为了预防鱼卵携带寄生虫或潜在致病菌,鱼卵从亲鱼塘采集后必须经过消毒处理^[41]才可以转入孵化系统,而放入孵化系统2d后检测其表面共生菌群组成发现潜在病原菌丰度有所增加,这可能是因为在孵化过程中出现死卵或死苗,导致孵化系统中有机质的积累,营造更适宜潜在致病菌生存的环境,从而滋生潜在病原菌。若孵化过程中暴发细菌性疾病,应及时从死苗、死卵或水体中检测病原菌,经菌株鉴定后尽快制定解决方案,避免出现大规模的鱼卵死亡,影响生产效益。

从微生物功能上看,研究显示甲醛消毒对鱼卵菌群功能的影响较小。氨基酸转运和新陈代谢、无机离子运输和代谢以及碳水化合物运输和代谢在罗非鱼卵菌群功能预测中的平均丰度占比较高。已有文献报道的其他水生生物的菌群功能与本文研究相似,如施金谷等人^[42]发现罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼虾肠道菌群的功能主要集中于碳水化合物代谢、氨基酸代谢等方面。赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)肠道微生物在氨基酸代谢和碳水化合物代谢中也起着重要作用^[43]。

目前在各领域,甲醛消毒法已普遍适用^[44-45]。本研究中,甲醛的质量分数为 1×10^{-4} 且消毒时间约为5~6h,但关于甲醛浓度大小以及消毒处理时间长短如何影响鱼卵菌群的变化还未见详细报道。过高浓度的甲醛溶液或较长的消毒时间也可能会破坏鱼卵表面菌群的结构与组成,从而影响鱼卵正常孵化。未来的研究还可从改变甲醛浓度梯度或调整消毒时间等方面设计实验来观察鱼卵表面共生菌群的结构与组成变化。

4 结 论

本文利用16S rRNA高通量测序技术在春、夏、秋、冬4个季节采集并分析了罗非鱼亲鱼塘未消毒鱼卵菌群(消毒前鱼卵,EP)以及经甲醛消毒后放入孵化系统第2d的鱼卵菌群(消毒后鱼卵,E2),并对其进行了功能预测。结果表明,罗非鱼卵经甲醛消毒放入孵化系统后菌群物种多样性显著降低,结构发生显著改变。消毒转入孵化系统后鱼卵菌群上潜在有益菌群的丰度降低,同时潜在致病菌群的丰度提高。氨基酸转运和新陈代谢、无机离子运输和代谢以及碳水化合物运输和代谢是罗非鱼卵菌群中主要的预测功能。

参考文献:

- [1] WANG M, LU M X. Tilapia polyculture: a global review[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(8): 2363-2374.
- [2] 代云云,袁永明,袁媛,等. 中国罗非鱼产业供求分析[J]. 中国农学通报, 2021, 37(7): 144-149.
- [3] GETINET G T. Effects of maternal age on fecundity, spawning interval, and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(5): 671-677.
- [4] 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.

- [5] VADSTEIN O, BERGH Ø, GATESOUBE F J, et al. Microbiology and immunology of fish larvae[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2013, 5(S1): S1–S25.
- [6] BHUJEL D R C. How to produce millions of high quality monosex tilapia fry: proceedings of the Ninth International Symposium on Tilapia in Aquaculture (ISTA 9), Shanghai, April 22–25, 2011 [C]. [S.l.]: [s.n.], 2011.
- [7] ABD EL-GAWAD E A, SHEN Z G, WANG H P. Efficacy of formalin, iodine and sodium chloride in improvement of egg hatching rate and fry survival prior to the onset of exogenous feeding in yellow perch[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(8): 2461–2469.
- [8] LAHNSTEINER F. Effect of disinfection of non-hardened *Salmo trutta* eggs with chloramine T®, Wofasteril®, and hydrogen peroxide on embryo and larvae viability, microorganism load, lipid peroxidation, and protein carbonylation[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(5): 1949–1962.
- [9] SALVESEN I, VADSTEIN O. Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals[J]. *Aquaculture International*, 1995, 3(3): 155–171.
- [10] BAI S J, HOU G. Microbial communities on fish eggs from *Acanthopagrus schlegelii* and *Halichoeres nigrescens* at the XuWen coral reef in the gulf of Tonkin[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8517.
- [11] DENG Y Q, CHENG C H, FENG J, et al. Rapid environmental change shapes pond water microbial community structure and function, affecting mud crab (*Scylla paramamosain*) survivability[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(5): 2229–2241.
- [12] DOWLE E, POCHON X, KEELEY N, et al. Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput sequencing[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(8): fiv089.
- [13] 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.
- [14] FARIEDAH F, WIDODO M S, NUSWANTORO S, et al. Hatching of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) egg in the hatching medium use salinity media and bromelain enzyme[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 718(1): 012027.
- [15] LI S X, QIAN Z J, YANG J N, et al. Seasonal variation in structure and function of gut microbiota in *Pomacea canaliculata*[J]. *Ecology and Evolution*, 2022, 12(8): e9162.
- [16] 李慧, 李宇飞, 孟子育, 等. 螯霖鱼肠道微生物多样性分析 [J]. *水产养殖*, 2020, 41(8): 1–6, 21.
- [17] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [18] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [19] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. 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.
- [20] 赖政, 盛颖, 肖力婷, 等. 鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落结构及功能预测分析 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(11): 4302–4314.
- [21] HANSEN G H, OLAFSEN J A. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(6): 1435–1446.
- [22] BONE A, BEKAERT M, PAPADOPOULOU A, et al. Bacterial communities of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) eggs at a commercial marine hatchery[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(1): 114–124.
- [23] MAAPEA A D, VINE N G, MACEY B M. Bacterial microbiome of dusky kob *Argyrosomus japonicus* eggs and rearing water and the bacteriostatic effect of selected disinfectants[J]. *Aquaculture*, 2021, 542: 736882.
- [24] ZHANG R, WU G T, ZHU J Y, et al. Povidone iodine exposure alters the immune response and microbiota of the gill and skin in koi carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738926.
- [25] NAJAFPOUR B, PINTO P I S, MOUTOU K A, et al. Factors driving bacterial microbiota of eggs from commercial hatcheries

- of European seabass and gilthead seabream[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2275.
- [26] 张春怡, 曲红云, 桑平, 等. 土壤消毒结合微生物菌剂防控茄子黄萎病及对根际真菌群落结构的影响[J]. *北方园艺*, 2020(7): 27–35.
- [27] 田甜, 张建明, 张德志, 等. 健康和患病中华鲟皮肤黏膜层微生物菌群结构特征[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(10): 1259–1270.
- [28] 王祯辉, 付建东, 薛淑霞. 溃疡病的发生对半滑舌鳎体表黏膜菌群结构的影响[J]. *天津农业科学*, 2023, 29(S1): 52–56, 62.
- [29] 李珊珊, 张伟佳, 高阳, 等. 光唇鱼仔稚鱼肠道菌群与养殖水体细菌群落的相关性[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(8): 1313–1322.
- [30] ALI S E, MAHANA O, MOHAN C V, et al. Genetic characterization and antimicrobial profiling of bacterial isolates collected from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) affected by summer mortality syndrome[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(12): 1857–1871.
- [31] ZHOU W, XIE M X, XIE Y D, et al. Effect of dietary supplementation of *Cetobacterium somerae* XMX-1 fermentation product on gut and liver health and resistance against bacterial infection of the genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 124: 332–342.
- [32] LIU H T, WANG S F, CAI Y, et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 326–333.
- [33] BADER J A, SHOEMAKER C A, KLESZIUS P H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(2): 209–220.
- [34] ALGAMMAL A M, MABROK M, SIVARAMASAMY E, et al. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *tox A* virulence genes and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *tetA* antibiotic-resistance genes[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 15961.
- [35] GONG C P, GUO M Y, LOU J F, et al. Identification and characterization of a highly virulent *Citrobacter freundii* isolate and its activation on immune responses in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 143: 109224.
- [36] ABDELLA B, ABOZAHRA N A, SHOKRAK N M, et al. Whole spectrum of *Aeromonas hydrophila* virulence determinants and the identification of novel SNPs using comparative pathogenomics[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 7712.
- [37] MALLIK S K, PATHAK R, SHAHI N, et al. Pathological analysis and antimicrobial susceptibility of *Chryseobacterium balustinum* RTFCP 298 isolated from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 13268.
- [38] DE SWAEF E, VAN DEN BROECK W, DIERCKENS K, et al. Disinfection of teleost eggs: a review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2016, 8(4): 321–341.
- [39] GUAN B Y, CAI Y, ZHOU Y C, et al. Pathogen identification, risk factor and preventive measure of a columnaris disease outbreak in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs and larvae from a tilapia hatchery[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738718.
- [40] CIPRIANO R C. Intraovum infection caused by *Flavobacterium psychrophilum* among eggs from captive Atlantic salmon broodfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2005, 17(3): 275–283.
- [41] 韦建京. 淡水鱼养殖中常见疾病的防治措施[J]. *畜禽业*, 2019, 30(2): 74, 76.
- [42] 施金谷, 武霞, 黄光华, 等. 不同种群罗氏沼虾幼体的肠道菌群结构与功能特征分析[J]. *水产科学*, 2023, 42(4): 674–681.
- [43] 赵园园, 杨丽敏, 孟金柱, 等. 赤眼鳟肠道菌群结构及其潜在功能研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 54(1): 47–54.
- [44] 刘芳. 种蛋在消毒与保存时的注意事项[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2018(9): 140.
- [45] 张令. 影响养殖场消毒效果的因素[J]. *当代畜牧*, 2015(2): 40–41.