

抗菌素对草鱼肠道免疫和菌群的影响

黄 垚, 秦真东, 陈嘉俊, 杨敏璇, 徐子正, 杨友成, 黎 烽,
詹凡玢, 李亚男, 李清清, 林 鑫*, 施 斐*

(仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225)

摘要: 为探究抗菌素对草鱼免疫和肠道菌群的影响, 本实验以草鱼为研究对象, 设置基础饲料(对照组)、基础饲料添加恩诺沙星或氟苯尼考3组饲料, 投喂草鱼2周后, 通过肠道酶活检测、荧光定量PCR(qRT-PCR)和高通量测序技术分析饲料中添加抗菌素对草鱼肠道免疫及肠道菌群多样性影响。分析结果显示, (1) 饲料中添加恩诺沙星和氟苯尼考降低了草鱼肠道谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量, 提高丙二醛(MDA)的含量, 导致草鱼肠道氧化应激。(2) 氟苯尼考组中的*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-12*、*NF- κ B-P65*、*MHC II*、*sIgM*等免疫因子和*ZO-1*、*ZO-2*、*occludin*、*CLDN-1*、*JAM3*等黏膜相关蛋白的mRNA表达量显著下降, 恩诺沙星组的免疫因子*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-12*、*TLR4*、*MHC II*和黏膜相关基因*ZO-2*、*occludin*、*CLDN-1*、*JAM3*的mRNA表达量显著下降。(3) 通过16S rRNA高通量测序来揭示拌食投喂抗菌素对草鱼肠道微生物群落结构的影响, 分析结果显示, 饲料中添加恩诺沙星或氟苯尼考对草鱼肠道 α 多样性无显著差异, 但对 β 多样性出现显著变化, 表明2种抗菌素对肠道菌群丰富度没有显著影响, 但会改变群落多样性。综上所述, 饲料中添加恩诺沙星和氟苯尼考会导致草鱼肠道氧化应激、调控黏膜免疫应答, 并影响肠道菌群的结构与多样性。本研究为草鱼病害防控相关研究及草鱼的绿色健康养殖提供了参考。

关键词: 草鱼; 抗菌素; 恩诺沙星; 氟苯尼考; 免疫力; 肠道菌群

中图分类号: S 942.2*6

文献标志码: A

抗菌素类药物是一类抗细菌活性的天然或人工合成化合物^[1], 是治疗细菌性疾病的有效手段, 在养殖业中大量应用, 同时长期使用造成抗菌素及其衍生物在动物体内蓄积^[2], 导致细菌耐药性增加^[3-4]。此外, 抗菌素在抑制病原菌的同时也会破坏动物机体的稳定, 降低其先天免疫应答能力^[5]。有研究表明, 使用氧四环素会导致虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体内白细胞和免疫球蛋白的

数量减少, 降低巨噬细胞的吞噬活性^[6]。也有研究发现, 使用不同种类的抗菌素, 会对机体产生不同程度的氧化损伤^[7]。肠道菌群对维持胃肠道的稳态和免疫系统稳态起着重要的作用。完整的肠道结构和正常的肠道功能有助于促进营养物质的吸收, 从而促进动物宿主对病原体的抵抗力^[8]。Choi等^[9]研究表明肠道菌群在药物代谢和毒性中起着重要作用。此外, 有研究发现抗菌素的使

收稿日期: 2022-06-29 修回日期: 2022-11-12

资助项目: 国家自然科学基金(4210061024); 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室联合资助开放课题(LMB20211004)

第一作者: 黄垚(照片), 从事淡水鱼类肠道健康研究, E-mail: 657858510@qq.com

通信作者: 林鑫, 从事水生动物疾病研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn;

施斐, 从事鱼类肠道健康研究, E-mail: fshi1203@126.com



用不会导致肠道菌群的总数量发生显著变化, 但会影响肠道菌群的组成, 改变肠道菌群的多样性和丰富度, 增加肠道中耐药菌株的数量及种类^[10]。

恩诺沙星是人工合成的氟喹诺酮类药物, 毒副作用小, 属于广谱抗菌药, 对革兰氏阴性和阳性菌具有广泛的抗菌作用。由于其对水生动物病原菌的抗菌活性较强^[11-12], 《渔药使用规范》(SC/T 1132—2016)已将其列为水产养殖处方药之一^[13]。恩诺沙星在水产动物的药物动力学研究主要包括克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)^[14]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[15]、中国对虾 (*Penaeus chinensis*)^[15]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[16] 等, 但关于恩诺沙星在水产动物肠道免疫和菌群的研究还十分缺乏。氟苯尼考为广谱抗菌药, 对革兰氏阴性菌及阳性菌均有较强的抗菌效果, 具有一定的免疫抑制作用。其理化性质稳定, 不易被水解和生物降解, 但长期使用会导致消化机能紊乱, 出现维生素缺乏或二重感染的症状^[17]。氟苯尼考对气单胞菌 (*Aeromonas*)、链球菌 (*Streptococcus*)、弧菌 (*Vibrio*) 和爱德华氏菌 (*Edwardsiella*) 等病原菌引起的鱼类疾病有明显的防治效果, 是世界范围内水产养殖中应用最广泛的药物之一^[18]。早期研究发现, 氟苯尼考暴露会抑制虹鳟吞噬细胞的吞噬、淋巴细胞增殖等过程^[19], 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的无节幼体有较高的毒性^[20], 但氟苯尼考对水产动物肠道菌群的影响还有待研究。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国的“四大家鱼”之一, 具有生长快、品质好等优良特性, 常年位居我国淡水养殖产量之首。据 2020 年渔业年鉴数据显示, 2019 年我国草鱼养殖产量高达 553 万 t, 占淡水鱼类养殖总产量的 18.36%^[21]。草鱼肠道中存在大量的微生物, 主要由变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 组成^[22]。随着养殖规模和密度的不断提高, 养殖环境的逐步恶化, 病原微生物感染频发, 导致草鱼大规模死亡, 造成严重的经济损失^[23]。因此, 开展草鱼病害防控相关研究对于其养殖产业的健康发展非常重要。本研究选择恩诺沙星及氟苯尼考 2 种渔用抗菌素进行拌食投喂, 探究其对草鱼肠道免疫和菌群的影响。本研究结果将加深我们对抗菌素的认识, 为草鱼的绿色健康养殖提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

草鱼 [体重 (64.00 ± 0.34) g] 购自广东省中山市养殖基地, 草鱼运回来之后暂养在 (28±2) °C 的水温度中, 保持溶氧充足, 水质干净。2 周后选取健康、体重均匀的草鱼。恩诺沙星 (CAS 号: 93106-60-6) 与氟苯尼考 (CAS 号: 73231-34-2) 标准品购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 实验设计

本次实验总共分为 3 组, 即基础饲料 (对照组)、基础饲料添加恩诺沙星和基础饲料添加氟苯尼考, 每组分 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼, 实验期为 2 周。恩诺沙星和氟苯尼考含量是根据《渔药使用规范》(SC/T 1132—2016)^[13] 和相关文献^[24-26], 恩诺沙星和氟苯尼考饲料含量均为 10 mg/kg。养殖期间水温保持在约 28 °C, 溶解氧大于 5 mg/L, pH 为 7.5。实验过程中操作人员严格遵守仲恺农业工程学院动物保护和使用委员会伦理规范, 并按照仲恺农业工程学院动物保护和使用委员会伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 免疫基因 mRNA 的表达分析

总 RNA 的提取按照 RNAiso Plus 试剂说明书进行, 提取草鱼后肠的总 RNA 浓度及纯度用超微量分光光度计 (NanoDrop2000, 美国) 和琼脂糖凝胶电泳进行检测。根据 NCBI 数据库下载草鱼免疫相关基因序列, 设计草鱼免疫相关基因上、下引物, 通过 PCR 扩增进行引物筛选, β -actin 作为内参基因 (表 1)。本实验选择的基因: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)^[27]、白细胞介素 12 (interleukin-12, *IL-12*)^[27]、Toll 样受体 4 (recombinant toll like receptor 4, *TLR4*)、核转录因子 κ B-P65 (nuclear transcription factor-kappa B-P65, *NF- κ B-P65*)^[28]、表面免疫球蛋白 M (surface immunoglobulin M, *sIgM*)^[28]、连接黏膜分子 (junctional adhesion molecule 3, *JAM3*)、闭合小环蛋白 [3 种 ZO 蛋白基因 (zonula occludens, *ZO-1*、*ZO-2*、*ZO-3*)]、闭合蛋白基因 (*occludin*)、跨膜蛋白 [2 种 CLDN 蛋白基因 (*CLDN-1*、*CLDN-6*)]、主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex II, *MHC II*)。以 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR), qRT-PCR 反应体系

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

基因 genes	引物名称 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	应用 application
<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α-F</i>	CGTATGGCGGGTGTGTGG	qRT-PCR
	<i>TNF-α-R</i>	AAAGCCTGGTCTGGTTC	
<i>IL-1β</i>	<i>IL-1β-F</i>	GTGTCTGGCCATTCCAAGAGTA	qRT-PCR
	<i>IL-1β-R</i>	GGTGTGAGAGTTTCAGTGACCT	
<i>IL-12</i>	<i>IL-12-F</i>	ACCATCTTCTACTTCCC	qRT-PCR
	<i>IL-12-R</i>	ACAGGTTCCATTCACCTCC	
<i>TLR4</i>	<i>TLR4-F</i>	GAATAATGGGCAGCCGTAAGTC	qRT-PCR
	<i>TLR4-R</i>	TCCTCTCTCCACATCTCCAGA	
<i>NF-κB-P65</i>	<i>NF-κB-P65-F</i>	TATTCCTGAAGCGAAGATCTGGG	qRT-PCR
	<i>NF-κB-P65R</i>	TTGGAGCTCTGTTGTCGTAGATG	
<i>sIgM</i>	<i>sIgM-F</i>	CTTTCCTCCGATGTATCACGC	qRT-PCR
	<i>sIgM-R</i>	TGAAACGATGACCCTGACATGT	
<i>JAM3</i>	<i>JAM3-F</i>	GTTAGTGTGATGATGTGTGGCTG	qRT-PCR
	<i>JAM3-R</i>	CGTCGAGCAGGTGATAAAATTGTC	
<i>ZO-1</i>	<i>ZO-1-F</i>	GTGAAAACACCCAGTGACATCAG	qRT-PCR
	<i>ZO-1-R</i>	CAATCTCCCAGGTGTCTAAAGCT	
<i>ZO-2</i>	<i>ZO-2-F</i>	GTGTTTCAAGTGTGGGTATCTGC	qRT-PCR
	<i>ZO-2-R</i>	GTTGTAACAGGTGTGTCGAAAGG	
<i>ZO-3</i>	<i>ZO-3-F</i>	AAGCACCTAACCTGGATGTAAG	qRT-PCR
	<i>ZO-3-R</i>	AGATTACCTCTGGGATCAGGTGA	
<i>occludin</i>	<i>occludin-F</i>	GCAGTACGGATTAGGTTACGGAT	qRT-PCR
	<i>occludin-R</i>	GTAAGGGGTCGGGTAAGAATTGT	
<i>CLDN-1</i>	<i>CLDN-1-F</i>	GCAGTACGGATTAGGTTACGGAT	qRT-PCR
	<i>CLDN-1-R</i>	GTAAGGGGTCGGGTAAGAATTGT	
<i>CLDN-6</i>	<i>CLDN-6-F</i>	CATCGGGAACAACATTGTAACGG	qRT-PCR
	<i>CLDN-6-R</i>	GTACAGATGAGCAAAGCGAGAAC	
<i>MHC II</i>	<i>MHC II-F</i>	CGACTTCTACCTCAACC	qRT-PCR
	<i>MHC II-R</i>	GGCGTGCTCCACCATAACA	
<i>β-actin</i>	<i>β-actin-F</i>	ACCCACACCGTGCCCATCTA	qRT-PCR
	<i>β-actin-R</i>	CGGACAATTCTCTTTCGGCTG	
16S rRNA V3-V4	343F	TACGGRAGGCAGCAG	Illumina测序
	798R	AGGGTATCTAATCCT	

(20 μ L): SYBR 酶 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 4 μ L, 双蒸水 5.2 μ L。qRT-PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.4 草鱼后肠抗氧化酶的测定

抗氧化酶的测试参考相关文献^[29], 从 3 组草鱼中每组随机选取 6 尾草鱼取后肠制成 10% 组织匀浆。实验测定了 3 组草鱼后肠中谷胱甘肽过氧

化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 的酶活性。所有酶活试剂盒均购置于南京建成生物科技有限公司, 测定方法按照试剂盒说明书进行。用碧云天生物技术 Bradford 蛋白测定试剂盒测定最终浓度并归一化为相应样品的蛋白浓度。

1.5 肠道菌群高通量测序

参考相关文献^[30-31], 从 3 组草鱼中每组随机

选取 6 尾草鱼取后肠做后续基因组 DNA 提取, 16S *rRNA* 高通量测序以及后续的生物信息学分析。对样品进行 DNA 的提取, 提取的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳和分光光度法 (260 nm/280 nm 吸光度) 进行质量检测。以 DNA 为模板, 使用高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 27 个循环; 72 °C 后保温 5 min。测序及后续数据分析处理过程由上海欧易生物医学科技有限公司进行。

1.6 生物信息学分析及数据分析

使用 Trimmomatic 软件对原始双端序列进行去杂, 利用 FLASH 软件对序列进行拼接, 并使用 UCHIME(version 2.4.2) 软件去除干净序列中的嵌合体, 得到用于可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 划分的优质序列。测序数据预处理生成优质序列之后, 采用 VSEARCH 软件, 按照 97% 的相似度进行 OTU 分类, 对比 Silva (version 123) 数据库比对注释, 得到每个 OTU 对应的物种信息, 物种比对注释使用 RDP classifier 软件, 保留置信区间大于 0.7 的注释结果。对测得的有效数据进行分类单元聚类、OTUs 丰度、 α / β 多样性分析。生物信息学分析利用 α 多样性指数, 包括 Simpson 指数、Chao 1 指数、Shannon 指数对肠道微生物 α 多样性进行分析。群落 β 多样性分析采用 unweighted-unifrac 和 binary-jaccard 算法, 用 QIIME 软件进行主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 以及聚类热图的绘制。用 SPSS 26.0 软件对多样性数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

实验结果用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 统计学检验利用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。最终结果利用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果

2.1 投喂抗菌素导致肠道氧化损伤

为了探究饲喂 2 种添加抗菌素类饲料对草鱼肠道的氧化损伤作用。本实验测定了 3 组草鱼肠道的 SOD、CAT、GPx、MDA 的酶活性。结果显示, 与对照组相比, 恩诺沙星组和氟苯尼考组中的 SOD、CAT 和 GPx 的含量显著下降 (图 1-a~c), MDA 含量显著增加 (图 1-d)。

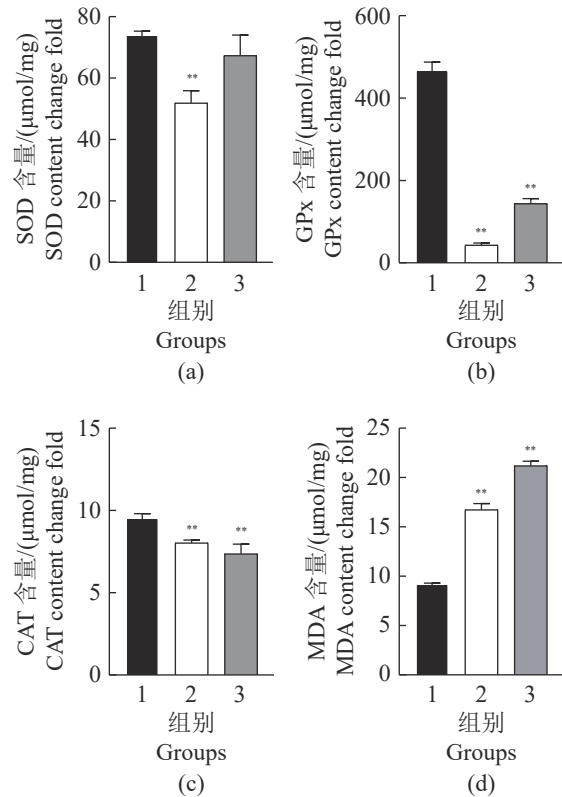


图 1 添加恩诺沙星与氟苯尼考饲料对草鱼后肠分析抗氧化酶活性

(a) SOD, (b) GPx, (c) CAT, (d) MDA; 1. 对照, 2. 恩诺沙星, 3. 氟苯尼考; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。

Fig. 1 The antioxidant enzyme activities in the hindgut of *C. idella* fed with dietary enrofloxacin and florfenicol

(a) SOD, (b) GPx, (c) CAT, (d) MDA; 1. control, 2. enrofloxacin, 3. florfenicol; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.2 抗菌素的投喂调控免疫相关因子的表达

为进一步探究饲喂 2 种抗菌素对草鱼肠道的免疫因子相关基因表达的影响, 本研究通过 qRT-PCR 检测了肠道中免疫相关基因的表达水平。与对照组相比, 恩诺沙星组和氟苯尼考组中的促炎因子如 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-12* 表达量均显著降低, 而恩诺沙星处理组中的 *NF- κ B-P65* 和 *sIgM* 表达量变化不明显, 氟苯尼考处理显著降低了 *NF- κ B-P65* 和 *sIgM* 的表达水平 (图 2-a)。

肠道屏障作为体内抵御病毒的三大屏障之一具有十分重要的作用。据报道, 抗菌素能通过肠道微生物区系及其衍生的单链脂肪酸对肠道屏障的完整性进行破坏^[32]。因此, 实验进一步研究了抗菌素对紧密连接蛋白的影响。与对照组相比, 恩诺沙星及氟苯尼考组投喂显著降低了 *ZO-1*、*ZO-2*、*occludin*、*CLDN-1*、*JAM3* 的表达水平 (图 2-b)。

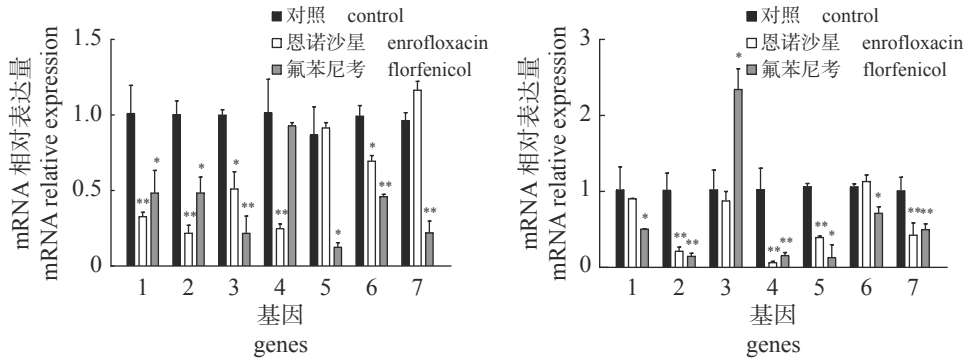


图 2 添加恩诺沙星与氟苯尼考饲料对草鱼肠道免疫相关因子 (a) 和肠道黏膜蛋白 (b) 的定量分析

Fig. 2 The mRNA relative expressions of intestinal immune related factors (a) and intestinal mucosa proteins related factors (b) of *C. idella* treated with dietary enrofloxacin and florfenicol

(a) 1. *TNFα*, 2. *IL-1β*, 3. *IL-12*, 4. *TLR4*, 5. *NF-κB-P65*, 6. *MHC II*, 7. *sIgM*; (b) 1. *ZO-1*, 2. *ZO-2*, 3. *ZO-3*, 4. *occludin*, 5. *CLDN-1*, 6. *CLDN-6*, 7. *JAM3*.

2.3 肠道微生物群落 α 多样性分析

实验利用高通量测序技术对 3 个实验组的草鱼后肠微生物群落组成和多样性进行了分析评估。结果显示, 3 个实验组共产生 3912 个 OTUs, 其中共有 OTUs 数量为 134 个 (图 3-a)。从图 3-b 中可以看出, 3 个分组的稀薄曲线在水平下趋于平坦, 并达到饱和, 说明所获得的序列可以反映每个样本中的大多数细菌多样性。基于 Kruskal-wallis 算法, α 群落多样性指数 Simpson、Chao 1、Shannon 在各组别之间差异不显著 ($P > 0.05$, 图 3-c~e)。α 多样性分析结果显示, 投喂恩诺沙星和氟苯尼考后肠道菌群丰富度和 α 多样性无显著性变化 ($P > 0.05$)。

2.4 抗菌素对肠道微生物群落相对丰度的影响

3 组草鱼后肠细菌群落结构在门分类水平上具有较高的多样性, 相对丰度前 15 种主要包括拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门 (Fusobacteria)、放线菌门等, 正常饲料组中的拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和梭杆菌门属于优势菌门, 恩诺沙星添加组对上述 4 种细菌门差异不显著, 而在氟苯尼考添加组中, 变形菌门及放线菌门的比例显著升高, 梭杆菌门的比例显著下降 (图 4-a)。

在属水平上的细菌群落组成如图 4-c 所示, 相对丰度前 15 的主要包含拟杆菌属 (*Bacteroides*)、鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、气单胞菌属、ZOR006、弧菌属、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、另枝菌属 (*Alistipes*) 等。恩诺沙星组与对照组相比, 气单胞菌属、ZOR006、希瓦氏菌属比例显著升高, 弧菌

属、另枝菌属和毛螺菌属等比例显著降低, 而氟苯尼考组与对照组相比, 拟杆菌属、气单胞菌属和希瓦氏菌属等比例显著升高, 鲸杆菌属、另枝菌属和螺杆菌属比例显著降低。

2.5 抗菌素对肠道微生物群落 β 多样性分析

基于 unweightedz-unifrac 和 binary-jaccard 2 种算法, 实验通过 PCoA 对 3 组肠道菌群的 β 多样性进行分析, 以确定样本之间总体群落结构的相似性。通过图 5 可以发现, 对照组与恩诺沙星组和氟苯尼考组无交叉区域, 不同组别明显分开。表明 3 组草鱼肠道菌群之间共有 OTUs 少, 3 组间的相似度较低。

2.6 抗菌素对肠道微生物群落物种的影响

在属水平上, 实验根据差异物种的相对丰度前 30 物种进行热图绘制。通过对恩诺沙星组和氟苯尼考组与对照组的比较, 发现较对照组而言, 恩诺沙星组差异物种相对较少, 氟苯尼考组差异物种相对较多 (图 6-a)。在这些差异物种中, 3 种病原菌分别是希瓦氏菌属 (图 6-b)、气单胞菌属 (图 6-c) 和肠球菌属 (*Enterococcus*, 图 6-d)。实验结果显示, 3 种菌在 3 组草鱼的肠道中表达量差异显著。希瓦氏菌属在恩诺沙星组和氟苯尼考组显著上升, 气单胞菌属在恩诺沙星组显著上升, 在氟苯尼考组差异不显著, 肠球菌属在氟苯尼考组显著上升, 但在恩诺沙星组差异不显著。

3 讨论

抗菌素作为防控细菌疾病的药物在水产养殖中已经广泛应用^[33]。抗菌素的使用在一定程度上

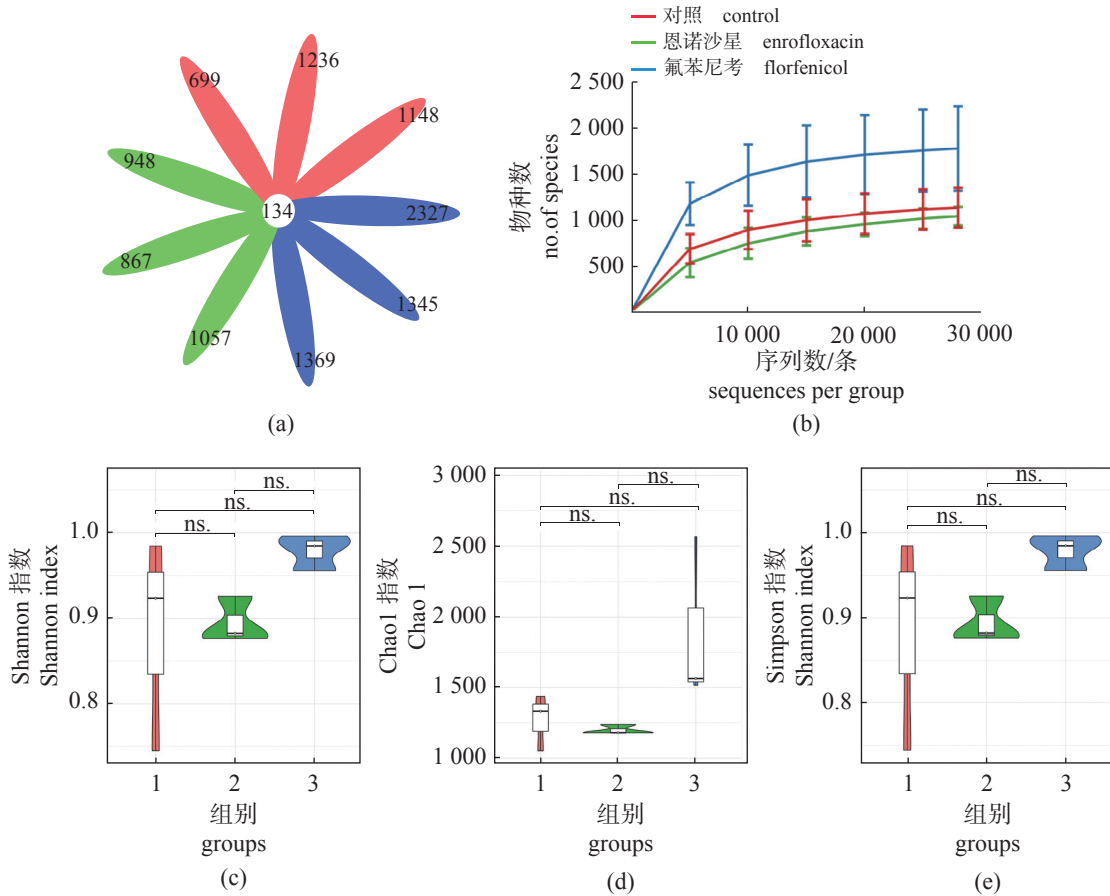


图3 饲喂添加恩诺沙星及添加氟苯尼考饲料的草鱼肠道菌群 α 多样性

(a) 每个样品共同和独有 OTU 数的韦恩图, (b) 基于 OTU 聚类阈值为 97% 相似性的不同分组的稀薄曲线, (c) Shannon 指数, (d) Chao 1 指数, (e) Simpson 指数; 多样性指数都是基于 Kruskal-wallis 算法; ns. 差异不显著 ($P > 0.05$); 下同。

Fig. 3 α diversity of the intestinal flora of *C. idella* fed with dietary enrofloxacin and florfenicol

(a) The Venn diagram of the number of common and unique OTUs for each sample, (b) rarefied curve of different groups based on the OTU clustering threshold of 97% similarity, (c) Shannon index, (d) Chao 1 index, (e) Simpson index; diversity index is based on Kruskal-wallis algorithm; ns. indicates that the difference is not significant ($P > 0.05$); the same below.

治疗细菌性疾病, 同时也会改变肠道菌群结构, 影响机体的免疫反应, 导致部分病原菌穿过肠道屏障, 并进入肠道中定殖^[34]。本次实验研究恩诺沙星和氟苯尼考对草鱼的免疫及肠道菌群结构和多样性的影响, 旨在为草鱼的健康养殖提供理论依据。

氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态, 由自由基在体内产生的一种负面作用。在鱼体的组织内存在一套完整的防御机制来保护机体免受氧化应激的损伤^[35]。SOD、CAT 和 GPx 等抗氧化酶是机体内主要的抗氧化酶, 能通过一系列反应消除氧自由基。MDA 是脂质过氧化物的最终产物, 其含量的高低能间接反映出氧自由基的含量^[36-37]。在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[38] 和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[39] 研究中, 投喂抗菌

素后, 抗氧化剂含量均显著下降, 与我们的实验结果相似。

肠道作为鱼类重要的免疫器官, 其免疫相关因子在免疫应答过程中起着关键作用。IL-1 β 、IL-12、TNF- α 是促进炎症反应的促炎因子^[36], NF- κ B-P65 和 TLR4 是免疫系统中的诱导表达的调节因子, sIgM 是 B 细胞分泌的一种基本抗体^[40-41], MHC II 是抗原递呈能力的标志^[42]。Fung 等^[43] 在鼠 (*Mus musculus*) 中发现, 抗菌素治疗促进小鼠大脑中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平, 调控了神经递质异常消化及代谢和神经元可塑性, 这与本实验结果相反。本次实验中, 氟苯尼考投喂显著降低了免疫因子 TNF α 、IL-1 β 、IL-12、TLR4、NF- κ B-P65、MHC II 的 mRNA 表达水平, 恩诺沙星对 NF- κ B-P65 和 sIgM 的表达水平没有显著影响。表明投喂

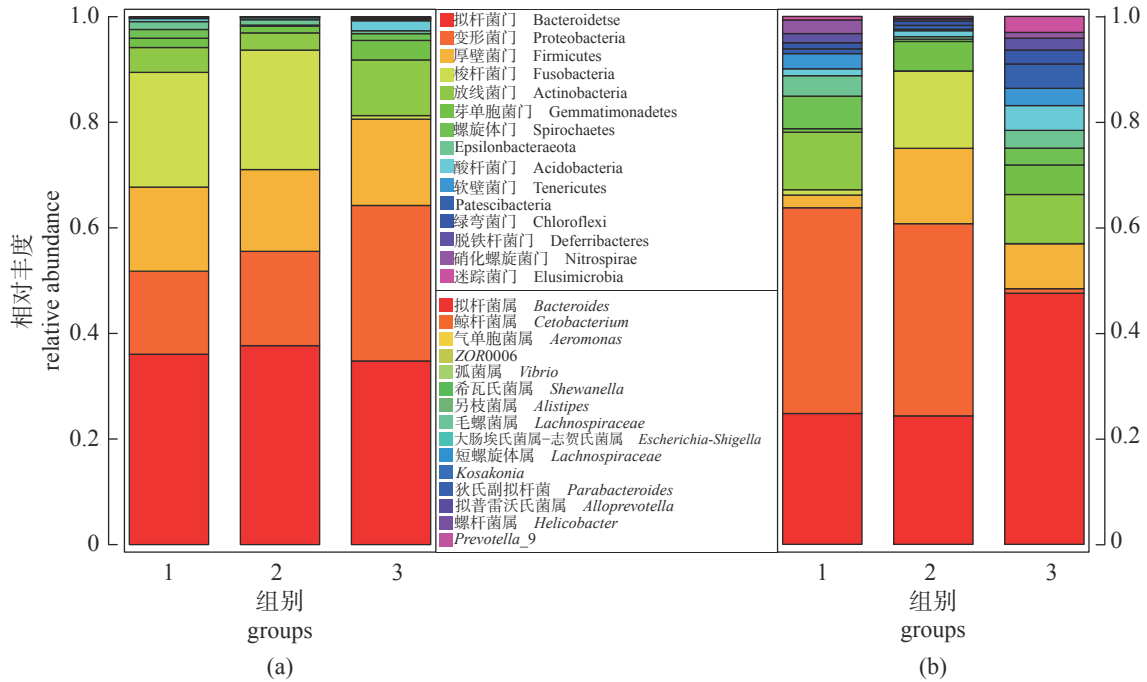


图 4 饲喂添加恩诺沙星 (a) 及添加氟苯尼考 (b) 饲料的草鱼肠道菌群门水平和属水平菌群结构及分布

Fig. 4 The structure and distribution of the intestinal flora of *C. idella* at the phylum level and genus level treated with dietary enrofloxacin (a) and florfenicol (b)

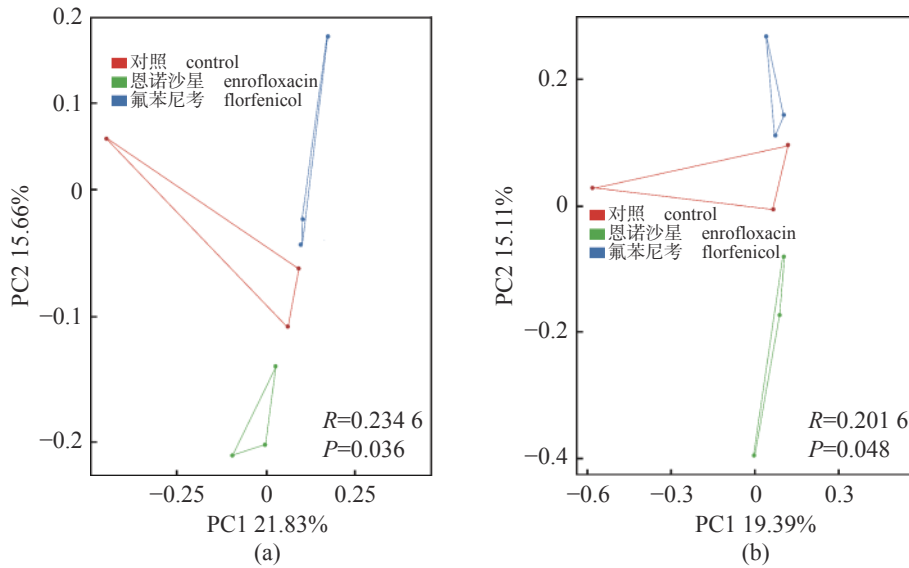


图 5 基于 unweighted-unifrac(a) 和 binary-jaccard(b) 算法的不同分组肠道菌群的主坐标分析

Fig. 5 The unweighted-unifrac (a) and binary-jaccard (b) algorithms used to analyze the principal coordinates of intestinal flora in different groups

不同抗菌素对草鱼机体免疫反应有着不同的影响。

肠道黏膜屏障是肠道三大屏障之一，能防止有害物质进入机体。紧密连接蛋白允许离子及小分子可溶性物质通过，阻挡毒性大分子及微生物的功能，这种特殊的功能在肠道黏膜屏障中具有举足轻重的功能^[44]。本次实验中，投喂 2 种抗菌

素后，黏膜免疫基因 *ZO-1*、*ZO-2*、*occludin*、*CLDN-1*、*CLDN-6* 和 *JAM3* 的 mRNA 表达水平降低，表明饲喂抗菌素类饲料对肠道黏膜免疫有一定的抑制作用。周利^[35]认为，长期将抗菌素作为饲料添加剂使用会破坏鱼的免疫系统，降低机体对疾病的抵抗能力。本次实验结果证实投喂恩诺

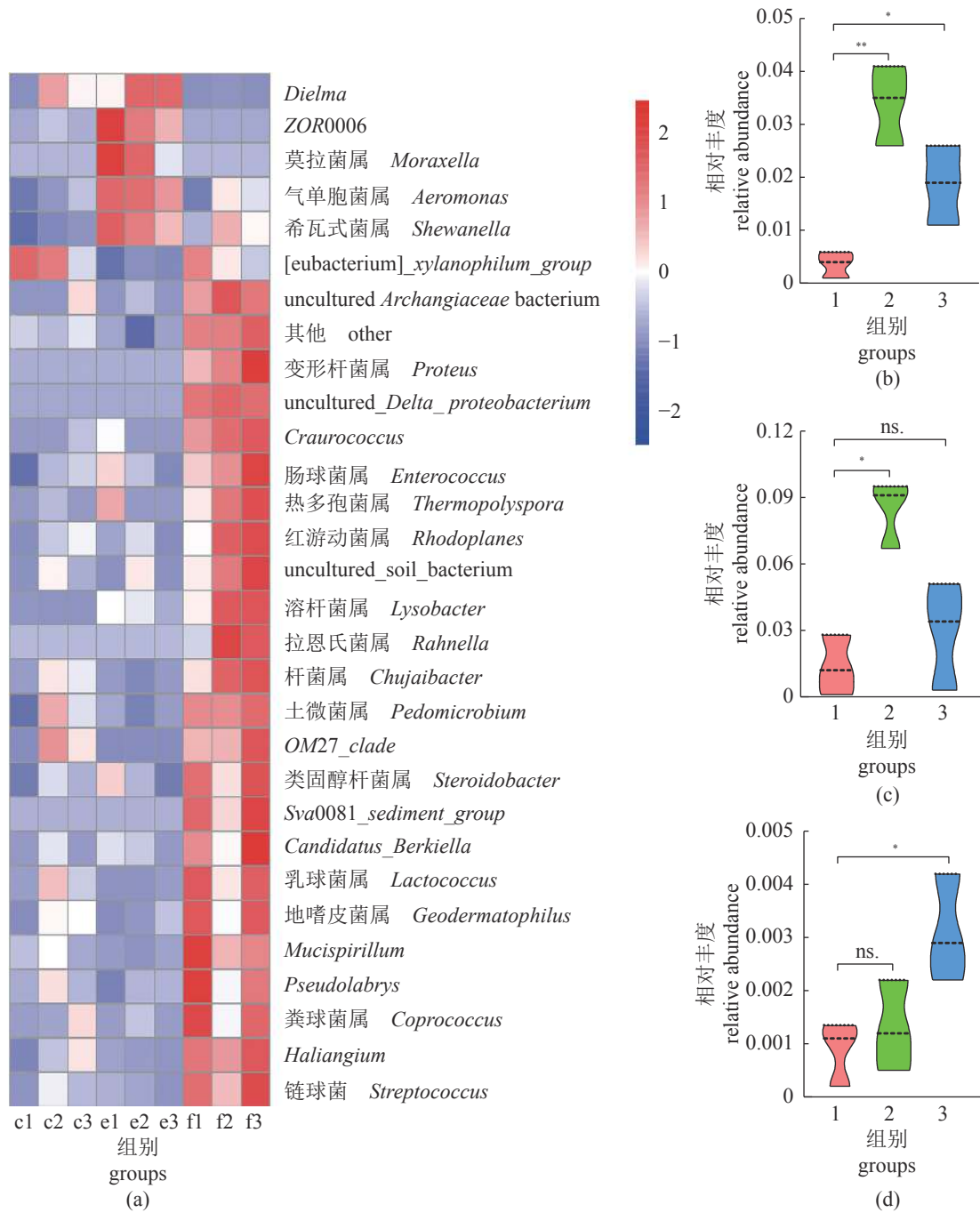


图 6 饲喂恩诺沙星及添加氟苯尼考的草鱼肠道菌群差异物种分析

(a) 属水平上差异物种热图, c、e 和 f 分别表示对照组、恩诺沙星组和氟苯尼考组; (b) 希瓦氏菌属; (c) 气单胞菌属; (d) 肠球菌属。

Fig. 6 Analysis of the different species of the intestinal flora of *C. idella* fed with dietary enrofloxacin and florfenicol

(a) The heat map of different species at genus level, c, e and f denote the control, enrofloxacin and florfenicol groups, respectively, (b) *Shewanella*, (c) *Aeromonas*, (d) *Enterococcus*.

沙星及氟苯尼考后降低肠道炎症的产生, 同时也破坏肠道黏膜免疫系统, 为病原菌入侵机体肠道提供了可乘之机。

不同动物的肠道细菌群落组成各不相同, 哺乳动物中最主要的门是厚壁菌门和拟杆菌门^[45]。

本研究显示, 梭杆菌门、拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、放线菌门为草鱼肠道菌群的优势菌门, 这与鲤 (*Cyprinus carpio*)^[46]、虹鳟^[47] 和斑马鱼^[48] 的研究一致, 且优势菌群的比例与其他学者的研究结果相似。有研究表明, 不同抗菌素对肠道菌群

的影响差异明显^[49-51]。鱼类肠道菌群不仅与内在因素密切相关^[52], 也与抗菌素的种类有关, 我们的结果也证实这一现象。

物种生态系统的稳定, 与物种多样性的丰富度息息相关^[53]。越来越多的研究表明, 抗菌素的使用不会影响肠道菌群的物种丰度, 但会改变肠道菌群的组成^[54-55]。Zhou 等^[55] 研究发现, 土霉素暴露组变形杆菌含量显著低于对照组, 而磺胺甲恶唑暴露组变形杆菌含量较对照组而言无显著差异性, 但均没有改变肠道菌群总的物种丰度, 我们的实验结果也发现, 不同抗菌素对不同细菌的影响不一样, 但并不会改变肠道菌群总的物种丰度。这表明投喂恩诺沙星和氟苯尼考虽然不会影响草鱼肠道菌群物种丰度, 但可能会通过抑制敏感微生物和促进机会性细菌的增殖来改变草鱼肠道菌群的组成^[56]。通过差异物种热图(图 6)分析, 我们发现与对照组相比, 不同物种在恩诺沙星组和氟苯尼考组的相对丰度有区别。希瓦氏菌属是一种革兰氏阴性菌, 一般为条件致病菌^[57], 但长期抗菌素的使用会导致病原菌发生变化^[58]。气单胞菌属为革兰氏阴性菌, 广泛分布于自然界的水中, 是水产动物重要的致病菌之一^[59], 其含量增加会导致鱼出现肠炎和败血症等疾病^[60]。肠球菌属为革兰氏阳性菌, 广泛存在于人和动物的肠道中, 在需氧革兰氏阳性球菌中, 它是仅次于葡萄球菌属的重要院内感染致病菌^[61], 但在水产养殖中也被当作一种有益菌添加到饲料中^[62]。与对照组相比, 恩诺沙星组和氟苯尼考组病原菌显著增加。与氟苯尼考对比, 恩诺沙星组病原菌增加的种类更少。

综上所述, 饲料中添加恩诺沙星或氟苯尼考会导致机体氧化应激, 影响机体免疫反应, 改变肠道菌群的组成, 且不同抗菌素对草鱼机体免疫和肠道菌群的影响存在一定差异, 本研究结果为草鱼病害防控和健康养殖提供新的理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010, 29(2): 169-178.
- Xu B J, Luo Y, Zhou Q X, *et al.* Sources, dissemination, and ecological risks of antibiotic resistances genes (ARGS) in the environment[J]. Environmental Chem-
- istry, 2010, 29(2): 169-178 (in Chinese).
- [2] 方美娟. 抗生素暴露斑马鱼对其子代生长发育及免疫系统的影响 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- Fang M J. Effects of antibiotics exposure to zebrafish on the offspring growth and development and immune system[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese).
- [3] Azzam-Sayuti M, Ina-Salwany Y, Zamri-Saad M, *et al.* The prevalence, putative virulence genes and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater fishes in peninsular Malaysia[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736719.
- [4] 魏欣. 抗生素及抗生素耐药基因摄入对小鼠肠道菌群耐药性影响的时空特征 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- Wei X. Spatial-and temporal-characteristics of the effect of antibiotic and antibiotic resistance genes ingestion on intestinal flora resistance in mice[D]. Jinan: Shandong University, 2020 (in Chinese).
- [5] 李子艳, 刘丽丽, 毛艳艳, 等. 抗生素与肠道菌群关系研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(21): 26-31.
- Li Z Y, Liu L L, Mao Y Y, *et al.* Current research on the relationship between antibiotics and intestinal flora[J]. *Science & Technology Review*, 2017, 35(21): 26-31 (in Chinese).
- [6] Yonar M E. The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 994-1001.
- [7] 吴海燕, 师丹阳, 杨栋, 等. 抗生素暴露大肠杆菌活性氧及抗氧化酶的变化[J]. *环境与健康杂志*, 2020, 37(4): 294-297.
- Wu H Y, Shi D Y, Yang D, *et al.* Variation of reactive oxygen species and antioxidant enzyme of *Escherichia coli* exposed to antibiotics[J]. *Journal of Environment and Health*, 2020, 37(4): 294-297 (in Chinese).
- [8] 林宜锦, 杨欢, 林鹏志, 等. 饵料中添加肉桂醛对日本鳗鲡肠道结构的影响[J]. *饲料研究*, 2022, 45(11): 52-55.
- Lin Y J, Yang H, Lin P Z, *et al.* Effect of cinnamaldehyde on intestinal structure of *Anguilla japonica* in diet[J]. *Feed Research*, 2022, 45(11): 52-55 (in Chinese).
- [9] Choi J J, Eum S Y, Rampersaud E, *et al.* Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome[J]. *Environmental Health Perspectives*,

- 2013, 121(6): 725-730.
- [10] Li L Y, Wang Q, Gao Y Y, *et al.* Colistin and amoxicillin combinatorial exposure alters the human intestinal microbiota and antibiotic resistome in the simulated human intestinal microbiota[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 750: 141415.
- [11] 于润林, 崔舒云, 程波, 等. 两种剂量下恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在虹鳟体内的代谢残留[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(6): 985-994.
- Yu R L, Cui S Y, Cheng B, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* orally administrated at two doses[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(6): 985-994 (in Chinese).
- [12] 刘蔚雯, 汪洋. 细菌对氟苯尼考的耐药机制研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(1): 1-6.
- Liu W W, Wang Y. Mechanisms of bacterial resistance to florfenicol[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2018, 26(1): 1-6 (in Chinese).
- [13] 中华人民共和国农业部. SC/T 1132-2016 渔药使用规范 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. SC/T 1132-2016 Fishery drug use standard[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [14] 王欢, 许荔立, 陈孝煊, 等. 不同温度下恩诺沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(1): 112-119.
- Wang H, Xu L L, Chen X X, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Procambarus clarkii* at different temperatures[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(1): 112-119 (in Chinese).
- [15] 徐维海, 林黎明, 朱校斌, 等. 恩诺沙星及其代谢产物在吉富罗非鱼、中国对虾体内的残留规律研究[J]. *水产科学*, 2004, 23(7): 5-8.
- Xu W H, Lin L M, Zhu X B. Residues of enrofloxacin and its metabolite in Jifu tilapia and *Penaeus chinensis*[J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(7): 5-8 (in Chinese).
- [16] 张天闻. 连续药饵投喂方式下恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在大黄鱼体内的残留消除研究[J]. *渔业研究*, 2020, 42(1): 29-35.
- Zhang T W. Residue elimination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Larimichthys crocea* at multiple dosages[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(1): 29-35 (in Chinese).
- [17] 张莺脐, 张羨宇, 郭庆芳, 等. 氟苯尼考对太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 早期发育的影响[J]. *海洋科学*, 2021, 45(1): 100-109.
- Zhang Y Q, Zhang X Y, Guo Q F, *et al.* Effects of florfenicol on the development of *Crassostrea gigas* during the early developmental stage[J]. *Marine Sciences*, 2021, 45(1): 100-109 (in Chinese).
- [18] 陈钊, 罗强, 常志强. 不同温度下氟苯尼考在大菱鲆体内的药代动力学研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(12): 32-38.
- Chen Z, Luo Q, Chang Z Q. Pharmacokinetics of florfenicol in Turbot (*Scophthalmus maximus*) at two water temperatures[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(12): 32-38 (in Chinese).
- [19] Lundén T, Lilius E M, Bylund G. Respiratory burst activity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs[J]. *Aquaculture*, 2002, 207(3-4): 203-212.
- [20] Williams R R, Bell T A, Lightner D V. Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1992, 4(4): 262-270.
- [21] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [22] Wu S G, Wang G T, Angert E R, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30440.
- [23] Song X H, Zhao J, Bo Y X, *et al.* *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an experimental model[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 171-178.
- [24] 刘开永, 汪开毓. 恩诺沙星在水产中的应用与研究[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(10): 32-34.
- Liu K Y, Wang K Y. Study and practice on enrofloxacin in fishery[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(10): 32-34 (in Chinese).

- [25] 马寅. 氟苯尼考和恩诺沙星在大黄鱼体内的代谢动力学研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
Ma Y. Pharmacokinetics of florfenicol and enrofloxacin in healthy and *Vibrio alginolyticus* infected *Pseudosciaena crocea*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012 (in Chinese).
- [26] 王栋栋, 田相利, 汪多, 等. 五种不同添加剂对凡纳滨对虾肠道菌群结构影响的研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2018(3): 132-141.
Wang D D, Tian X L, Wang D, *et al.* Effects of five additives on the community structure of intestinal microflora of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(3): 132-141 (in Chinese).
- [27] 秦真东, 杨敏璇, 卢志杰, 等. 血红蛋白介导草鱼肾细胞 (CIK) 凋亡的机制 [J]. *水产学报*, 2023, 47(7): 079412-1-079412-12.
Qin Z D, Yang M X, Lu Z J, *et al.* Study on the mechanism of hemoglobin-mediated apoptosis in *Ctenopharyngodon idella* kidney cell line (CIK) of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(7): 079412-1-079412-12(in Chinese).
- [28] Shi F, Zi Y J, Lu Z J, *et al.* *Bacillus subtilis* H2 modulates immune response, fat metabolism and bacterial flora in the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 8-20.
- [29] 秦真东, 卢志杰, 杨敏璇, 等. 草鱼体内溶血对肝脏氧化损伤的机制[J]. *水产学报*, 2021, 45(11): 1886-1898.
Qin Z D, Lu Z J, Yang M X, *et al.* Mechanism of liver oxidative damage induced by hemolysis in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1886-1898 (in Chinese).
- [30] Shi F, Qiu X L, Nie L J, *et al.* Effects of oligochitosan on the growth, immune responses and gut microbes of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 563-573.
- [31] Shi F, Lu Z J, Yang M X, *et al.* *Astragalus* polysaccharides mediate the immune response and intestinal microbiota in grass carp (*Ctenopharyngodon Idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736205.
- [32] Feng Y H, Huang Y L, Wang Y, *et al.* Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218384.
- [33] 李丹怡, 王许诺, 张广桔, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)研究进展[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(05): 166-176.
Li D Y, Wang X L, Zhang G J, *et al.* Advances on antibiotic resistance genes (ARGs) in aquaculture environment[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(05): 166-176 (in Chinese).
- [34] 方鼎丽, 方芳, 郭沁园, 等. 抗生素对肠道定植抗力的影响研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(2): 113-120.
Fang D L, Fang F, Guo Q Y, *et al.* Research progress on the effect of antibiotics on intestinal colonization resistance[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2021, 46(2): 113-120 (in Chinese).
- [35] 周利. 饲料和水环境中抗生素的长期暴露对斑马鱼生理功能的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
Zhou L. Effects of long-term exposure to antibiotics in feed and water environment on the physiological function of zebrafish[D]. Shanghai: East China Normal University, 2017 (in Chinese).
- [36] SEREZLI R, ÇAĞIRGAN H, OKUMUŞ I, *et al.* The effect of oxytetracycline on non-specific immune response in sea bream (*Sparus Aurata* L. 1758)[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29(1): 31-35.
- [37] Haak B W, Lankelma J M, Hugenholtz F, *et al.* Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 3(74): 782-786.
- [38] Sehonova P, Tokanova N, Hodkovicova N, *et al.* Oxidative stress induced by fluoroquinolone enrofloxacin in zebrafish (*Danio rerio*) can be ameliorated after a prolonged exposure[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2019, 67: 87-93.
- [39] Zhang Y Y, Wang L F, Zhuang H, *et al.* Excessive use of enrofloxacin leads to growth inhibition of juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169: 344-352.
- [40] 吴康, 黄晓声, 金洁南, 等. 饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力及免疫机能的影响[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(2):

- 250-258.
- Wu K, Huang X S, Jin J N, *et al.* Effects of feeding with faba bean (*Vicia faba*) on the antioxidant capability and immune functions of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 250-258 (in Chinese).
- [41] 王培, 鲁义善, 王蓓, 等. 无乳链球菌诱导吉富罗非鱼分泌型免疫球蛋白M(sIgM)重链基因的克隆及原核表达[J]. *生物技术通报*, 2014(2): 116-123.
- Wang P, Lu Y S, Wang B, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of secretory form of immunoglobulin M (sIgM) heavy chain gene in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) induced by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(2): 116-123 (in Chinese).
- [42] Ong C E B, Cheng Y Y, Siddle H V, *et al.* Class II transactivator induces expression of MHC-I and MHC-II in transmissible Tasmanian devil facial tumours[J]. *Open Biology*, 2022, 12(10): 220208.
- [43] Fung T C, Olson C A, Hsiao E Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20(2): 145-155.
- [44] Vaziri N D, Goshtasbi N, Yuan J, *et al.* Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 36(5): 438-443.
- [45] Qin J J, Li R Q, Raes J, *et al.* A Human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [46] 徐佳莹, 李演, 谢芝玲, 等. 三种淡水鱼类在中国南北两个地区的肠道菌群差异比较[J]. *激光生物学报*, 2020, 29(01): 68-74.
- Xu J Y, Li Y, Xie Z L, *et al.* Comparison of intestinal microflora of three freshwater fishes in two regions of north and south china[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2020, 29(01): 68-74 (in Chinese).
- [47] Desai A R, Links M G, Collins S A, *et al.* Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 350-353: 134-142.
- [48] Gidey T T. 高糖和高脂饮食对斑马鱼生长、代谢、器官健康、肠道菌群及水体代谢产物谱的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- Gidey T T. The Effect of High sugar and high fat diets on growth, metabolism, organ health, gut microbiota and metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [49] 杜海洋, 杨光勇, 张庚馨, 等. 基于16S *rRNA*高通量测序研究氨苄西林钠对SD大鼠肠道菌群结构的影响[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(11): 29-34.
- Du H Y, Yang G Y, Zhang G X, *et al.* Effect of ampicillin sodium on the structure of intestinal flora in SD rats Based on 16S *rRNA* high-throughput amplification[J]. *Acta Ecologicae Animalis Domastici*, 2020, 41(11): 29-34 (in Chinese).
- [50] 楚文庆. 四环素对斑马鱼肝脏和肠道菌群影响的研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2020.
- Chu W Q. Tetracycline for research on the effects of zebrafish liver and intestinal flora[D]. Tongliao: Inner Mongolia University for the Nationalities, 2020 (in Chinese).
- [51] 刘军, 张楠, 张雨笑, 等. 基于16S *rRNA*基因测序比较分析不同抗生素干预对小鼠肠道菌群动态变化的影响[J]. *微生物学免疫学进展*, 2021, 49(2): 20-27.
- Liu J, Zhang N, Zhang Y X, *et al.* Use of 16S *rRNA* high-throughput sequencing for comparative analysis of dynamic changes of gut microbiome in mice after intervention with different antibiotics[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2021, 49(2): 20-27 (in Chinese).
- [52] Li J, Ni J, Li J, *et al.* Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(6): 1750-1760.
- [53] 石娇星, 许滔山, 方晓晨, 等. 中国东部海岛黑松群落功能多样性的纬度变异及其影响因素[J]. *植物生态学报*, 2021, 45(2): 163-173.
- Shi J X, Xu M S, Fang X C, *et al.* Latitudinal variability and driving factors of functional diversity in *Pinus thunbergii* communities across sea-islands in Eastern China[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2021, 45(2): 163-173 (in Chinese).
- [54] Rodrigues S, Antunes S C, Correia A T, *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pro-oxidant and genotoxic responses following acute and chronic exposure to the antibiotic oxytetracycline[J]. *Ecotoxicology*, 2017, 26(1): 104-117.

- [55] 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.
- [56] Navarrete P, Mardones P, Opazo R, *et al.* Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of atlantic salmon[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2008, 20(3): 177-183.
- [57] Cao W R, Li X, Sun Y Y, *et al.* *Shewanella nanhaiensis* Sp. Nov., a marine bacterium isolated from sediment of south China sea, and emended descriptions of *Shewanella woodyi*, *Shewanella hanedai* and *Shewanella canadensis*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(12): 005152.
- [58] Tan B Y, Li Y B, Xie H F, *et al.* Microplastics accumulation in mangroves increasing the resistance of its colonization *Vibrio* and *Shewanella*[J]. *Chemosphere*, 2022, 295: 133861.
- [59] Xu C H, Lin Q S, Zhao Y Q, *et al.* Clinical characteristics and risk factors of *Aeromonas* bloodstream infections in patients with hematological diseases[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2022, 22(1): 303.
- [60] Kumar C B, Kumar A, Paria A, *et al.* Effect of spatio-temporal variables, host fish species and on-farm biosecurity measures on the prevalence of potentially pathogenic *Aeromonas* species in freshwater fish farms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(3): 1700-1712.
- [61] Avberšek J, Mićunović J, Šemrov N, *et al.* Surveillance of the source of poultry infections with *Enterococcus hirae* and *Enterococcus cecorum* in slovenia and *E. hirae* antibiotic resistance patterns[J]. *The New Microbiologica*, 2021, 44(4): 210-216.
- [62] Akbari H, Shekrabi S P H, Soltani M, *et al.* Effects of potential probiotic *Enterococcus casseliflavus* (EC-001) on growth performance, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(5): 1316-1325.

Effects of antimicrobials on intestinal immunity and microflora in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

HUANG Yao, QIN Zhendong, CHEN Jiajun, YANG Minxuan, XU Zizheng, YANG Youcheng, LI Feng, ZHAN Fanbin, LI Yanan, LI Qingqing, LIN Li*, SHI Fei*

(Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) were fed with basic feed (control group), basic feed supplemented with enrofloxacin or florfenicol for two weeks, respectively. Thereafter, enzyme activity, real time quantitative PCR (qRT-PCR), and high-throughput sequencing were used to analyze the effects of these two antimicrobials on the intestinal oxidative stress, immunity and intestinal microflora of *C. idella*. The results showed that, (1) additions of enrofloxacin and florfenicol could reduce the content of glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the intestines of *C. idella*, while they increased the amount of malondialdehyde (MDA), resulting in oxidative stress in the intestines of *C. idella*. (2) In the florfenicol group, the mRNA expressions of immune related factors, including *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-12*, *NF- κ B-p65*, *sIgM* and intestinal mucosa-related protein *ZO-1*, *ZO-2*, *occludin*, *CLDN-1* and *JAM3* were significantly lower than those in the control group. In the enrofloxacin group, the mRNA expressions of immune related factor, including *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-12*, *TLR4*, *MHC II* and intestinal mucosa-related protein *ZO-2*, *occludin*, *CLDN-1* and *JAM3* were significantly lower than those in the control group. (3) The results of high throughput 16S *rRNA* sequencing showed that the additions of antimicrobials had no significant effects on α diversity ($P > 0.05$) of microflora in *C. idella* intestine. However, there were significant changes in β diversity ($P < 0.05$). The results showed that neither of the two antibiotics affected the community richness, but they changed the diversity among the sample communities. Taken together, dietary enrofloxacin and florfenicol could cause oxidative stress, inhibit the intestinal immunity as well as affect the intestinal microflora of *C. idella*. This study provides a reference for the researches related to the prevention and control of *C. idella* diseases and the green and healthy culture of *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; antimicrobial; enrofloxacin; florfenicol; immunity; intestinal microflora

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

SHI Fei. E-mail: fshi1203@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (4210061024); Open Foundation of Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences (LMB20211004)