文章编号：1000-0615(2022)11-2186-10 水产学报, 2022, 46(11): 2186−2195

水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA
DOI: 10.11964/jfc.20201012441
Science Press

大鲵皮肤溃疡死亡相关的微生物区系

许峻旗[1]， 谢建平[2]， 王志坚[1*]

(1. 西南大学生命科学学院，淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室，水产科学重庆市重点实验室，重庆 400715；
2. 西南大学生命科学学院，现代生物制药研究所，三峡库区生态环境与生物资源国家重点实验室培育基地，重庆 400715)

摘要：为了分析自然环境中病死大鲵和健康大鲵皮肤及水样的微生物区系差异，实验通过高通量 16S *rDNA* 的 V4~V5 区测序，对皮肤微生物区系进行差异分析，探讨大鲵在患病前后微生物区系的变化。健康大鲵和病死大鲵生活水样以及皮肤菌群的多样性、结构和功能存在显著差异。各样品序列标签 (Tag) 数量平均为 97 150 条，测序平均长度为 400 bp，操作分类单元 (OTUs) 数据显示，健康大鲵生活水样和皮肤的微生物丰度远远高于病死大鲵。在健康大鲵生活水样中的优势菌群为砷氧化菌属，而当大鲵病死后，其生活水样的优势菌群变为金黄杆菌属。同样，在病死大鲵皮肤样本中金黄杆菌属、丛毛单胞菌属、伯克氏菌目的微生物菌群丰度显著升高，而砷氧化菌属、微小杆菌属、莱比托泉动性球菌等微生物菌群丰度显著下降。同时，病死大鲵皮肤表面有大量溃疡并伴有菌毛，具有典型的伯克氏菌属感染症状。研究表明，大鲵患病死亡前后皮肤微生物区系差异明显，人兽共患病菌伯克氏菌属可能是通过水媒传播感染自然环境下的大鲵并导致死亡的主要病原菌，为科学养殖大鲵、保护野生大鲵以及开发益生菌改善大鲵养殖环境提供依据。

关键词: 大鲵；致病微生物；区系结构；16S *rDNA*

中图分类号: S 941.1 **文献标志码:** A

大鲵 (*Andrias davidianus*) 俗称“娃娃鱼”，是中国特有的二级保护野生动物，属两栖纲 (Amphibia) 有尾目 (Caudata) 隐鳃鲵科 (Cryptobranchidae)。隐鳃鲵科有 2 个属，即大鲵属 (*Andrias*) 和隐鳃鲵属 (*Cryptobranchus*)，其中大鲵属包含了大鲵和日本大鲵 (*A. japonicas*，又名大山椒鱼)，隐鳃鲵属则只包含存在于北美洲的美国隐鳃鲵 (*C. alleganniesis*)。传统的分类将中国野生大鲵统一归属于一个物种——大鲵，但新的研究已经证实在博物馆中的大鲵标本至少分属于 3 个物种，即中国北方大鲵 (*A. davidianus*)、中国南方大鲵 (*A. sligoi*) 以及一个还未被鉴定的物种[1]。大鲵主要分布在长江、黄河及珠江流域的山溪或溶洞水系中，尤其在四川、重庆、贵州、湖北、湖南、河南等省市居多[1]。中国大鲵体长可达 1.8 m 以上，体质量可超 50 kg，是现存最大的两栖动物。由于大鲵具有独特的药用价值和食用价值，长期遭到人类的捕杀，加上栖息地被破坏和生存环境丧失等因素，大鲵的种群分布大幅度缩小，目前已处于濒危状态[2-3]。因此，为减少人类对野生大鲵的捕杀，国内开始养殖大鲵，并以此为保护野生大鲵提供科学依据[4]。目前，虽然我们国家成立了数个大

收稿日期：2020-10-14 **修回日期：**2021-01-08
资助项目：国家重点研发计划 (2016YFC0502304)；2020 年重庆市博士后研究项目 (7820100597)
第一作者：许峻旗 (照片)，从事水产养殖病原微生物功能基因组与防控措施研究，E-mail：185269261@qq.com
通信作者：王志坚，从事鱼类资源保护、开发利用方面研究，E-mail：wangzj@swu.edu.cn

鲵养殖研究中心，已经成功实现人工培育大鲵的目标，但仍然存在许多问题威胁着大鲵的商业化进程，关键瓶颈之一就是细菌性感染导致的高死亡率[5]，这给大鲵养殖产业带来了严重的经济损失。

由于大鲵对生存环境的要求非常高，养殖大鲵的场所一般设在大鲵自然分布的流域[6]。本次研究的样品来源于重庆市酉阳县某大鲵养殖基地，酉阳县为典型的喀斯特溶岩地貌区，县内地形崎岖，属亚热带季风湿润气候，是重庆著名的大鲵自然保护区[7]。该保护区位于酉阳境内的细沙河，水域长达 39 km，水浅流急，含沙量小，清澈见底，水温较低，多深潭、岩石孔洞，有洄流，是不可多得的大鲵繁殖栖息地。基地现有繁殖大鲵上千尾，年产值在数百万以上。2020 年 6 至 8 月，20 多尾体质量在 15 kg 以上的成年大鲵，由于细菌性感染陆续病死，损失惨重。

在大鲵体内，微生物区系对宿主的生理、营养和健康都发挥着非常重要的作用[8]。而致病微生物的致病因素多样且复杂，通常会侵袭易受免疫应激损伤的宿主。由于特殊的传染机制，许多感染水生动物的致病微生物也会感染人类[9]。目前很少有利用最新一代的测序技术研究微生物区系组成与水生动物健康的相互作用关系，特别是稀有保护动物——大鲵，极少量的研究集中于人工繁殖和保护，缺乏针对大鲵微生物区系的高通量测序研究。因此，本实验以该养殖基地病死大鲵和健康大鲵为研究对象，利用高通量测序技术探究健康大鲵和病死大鲵皮肤细菌区系组成及多样性的差异。

1　材料与方法

1.1　样品采集

实验用健康大鲵和病死大鲵样本均采集于重庆市酉阳县龙啸大鲵养殖专业合作基地，养殖于人工建造的地下水泥池中 (规格为 2.2 m×1.3 m×0.4 m)。养殖水源来自于无污染地下水，pH 为 6.5~7.4，水温为 18~22 °C，水深 15 cm，模拟黑暗洞穴环境，采集时健康大鲵和病死大鲵的生活水体完全隔离。大鲵生活水环境样品直接通过无菌移液器于水池底部上方 10 cm 处吸取 1 mL 水样加入 DNA 保护管中。1~3 号样本分别为健康大鲵生活水样，4~6 号样本分别为病死大鲵生活水样，各样本分别各取 3 次平行。8~10 号样本分别为从 3 尾成年病死大鲵尾部利用无菌手术刀切割病死大鲵尾部的皮肤组织，面积约 2 cm×2 cm，转移到无菌 DNA 保护液中，密封。7 号样本为从同样规格的成年健康大鲵尾部切割面积约 2 cm×2 cm 的皮肤作为阳性对照，转移到无菌 DNA 保护液中，密封。所有样本都保存于−20 °C。由于切割可能导致成年健康大鲵感染并死亡，因此健康成年大鲵的尾部皮肤样本只取自 1 尾健康大鲵。11~12 号分别为 2 尾病死大鲵肝脏组织样本，切割约指甲盖大小肝组织置于 DNA 保护液中，−20°保存。13~15 号样本为病死大鲵肠道组织样本，分别截取 3 尾病死大鲵约 2 cm 肠道组织于 DNA 保护液中，−20°保存。

1.2　微生物区系多样性分析

直接将采集的生物样本送上海微基生物科技有限公司进行总 DNA 提取和 16S *rDNA* 高通量测序。测序区域为 V4~V5 区[10]。α 多样性 (α diversity) 包括 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数以及 PD_whole_tree 指数等。其中，Chao1 指数和 ACE 指数反映样品中群落的丰富度 (species richness)，即简单指群落中物种的数量，而不考虑群落中每个物种的丰度情况。这 2 个指数对应的稀释曲线还可以反映样品测序量是否足够。如果曲线趋于平缓或者达到平台期，即可认为测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种；反之，则表示样品中物种多样性较高，还存在较多未被检测到的物种。而 Shannon-Wiener 指数以及 Simpson 指数反映群落的多样性 (species diversity)，受样品群落中物种丰富度和物种均匀度 (species evenness) 的影响。物种丰富度相同的情况下，群落中各物种的均匀度越大，则认为群落的多样性越丰富。PD_whole_tree 指数是基于系统发生树计算的一种多样性指数，即利用各个样品中操作分类单元 (OTUs) 的代表序列计算出构建系统发生树的距离，将某一样品中的所有代表序列的枝长加和，从而得到的数值。

1.3　测序结果和克隆文库分析

针对样本 PCR 扩增产物测序得到的双端测序读序 (Paired-end reads，PE reads) 结果，首先根据不同的条形码 (barcode) 区分每个样本，然后对序列质量进行质控和过滤，再根据重叠关系进行拼接，拼接后的序列再次进行质控和过滤，最后得到有效序列。有效序列的拼接采取按窗口去低质

量的方法，具体操作：①在 50 bp 的窗口下，如果窗口内的平均质量值低于 20，从窗口开始截去后端碱基，过滤质控后长度在 50 bp 以下的短序列 (reads)；②根据 PE reads 之间的重叠关系，将成对 reads 拼接成一条序列[11]，最小重叠长度为 10 bp；③拼接序列的重叠区允许的最大错配比率为 0.2，去除不符合的序列；序列质控采用 Trimmomatic 软件，拼接采用 FLASH 软件[12]。优化序列进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析，基于 OTU 聚类分析结果，对 OTU 进行多样性指数分析 (样本内的 α多样性分析)，以及对测序深度的检测；基于分类学信息，在各个分类水平上进行区系结构的统计分析，并对样本之间进行 β 多样性分析[13]。在上述分析的基础上，进行一系列区系结构和系统发育等深入的统计学和可视化分析。

2 结果

2.1 致病性分析

肉眼观察发现，健康大鲵的皮肤光滑且富有黏液，病死大鲵皮肤却呈现大面积溃疡并伴有绒毛，暗示病死大鲵可能是死于皮肤致病菌的感染 (图 1)。通过调查得知，患病大鲵首先表出现圆形黄斑，1~2 d 出现大面积扩散，呈花斑状，患病大鲵一般会在发现溃疡后 48 h 内死亡，属于快速致病性病菌感染[14]。

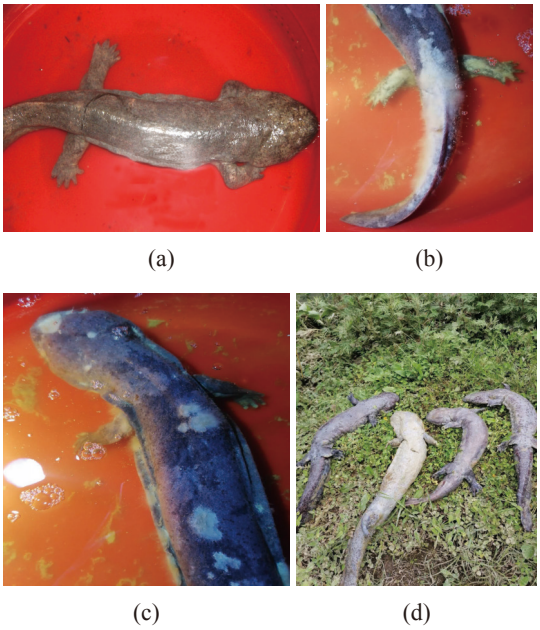


图 1 大鲵病理观察图片

(a) 健康大鲵样；(b) 患病大鲵尾部菌毛；(c) 患病大鲵皮肤溃疡；(d) 病死大鲵样

Fig. 1 Pathological observation of *A. davidianus*

(a) healthy *A. davidianus*; (b) the tail fimbria of the diseased *A. davidianus*; (c) skin ulcers of the infected *A. davidianus*; (d) dead *A. davidianus*

2.2 患病大鲵的微生物 α 多样性显著降低

为了确定患病大鲵的微生物区系变化，对不同皮肤样本进行高通量测序后，测序结果先剔除冗余数据，有效的样品序列标签 (Tag) 数量在 37 023~51 751 条，平均为 42 685 条，测序长度 409~412 bp，平均为 400 bp。序列比对后，获得聚类相似性为 97% 的 OTU 有 741 个，Shannon-Wiener OTU 稀释曲线趋于平坦 (图 2-a)，说明测序结果已经饱和，测序数据量合理。为了得到更高质量及更精准的生物信息分析结果，利用 mothur V.1.39.5 优化了 OTU 数据，其中健康大鲵皮肤 (7 号) 样本的 OTU 数量远高于其他样本，反映了健康大鲵皮肤的微生物区系组成丰度最高。同时，丰度等级曲线也显示 7 号样本的曲线范围最大，丰度远高于病死大鲵皮肤样本 (8、9、10 号)，并且 7 号样本的曲线更加平缓，表示健康大鲵的皮肤菌群密度更加均匀，处于相互平衡的状态 (图 2-b)。而无论是 OTU 的数量、ACE、Chao1 指数还是 Shannon-Wiener 指数，健康大鲵皮肤 (7 号) 都高于病死大鲵皮肤 (8，9，10 号) 以及其他样本。与此同时，7 号样本的 Simpson 指数却显著低于其他样本组 ($P<0.05$)，表明微生物多样性在健康大鲵皮肤中比患病的大鲵皮肤更高 (图 2)。

2.3 厚壁菌门在健康大鲵皮肤微生物区系组成中占据优势

通过微生物种群系统发育分析，对每个样本中物种丰度大于 0.5% 的 OTU 归为一个分类，本研究确定了 22 个主要的门，其中占 2% 以上的有 6 个门 (表 1)，其中，变形菌门 (Proteobacteria) 在所有样本中几乎都是优势菌群，放线菌门 (Actinobacteria) 则只在健康大鲵生活水样 (1~3 号) 中占据优势。当大鲵感染病菌病死后，病死大鲵生活水样 (4~6 号) 中优势菌群变为拟杆菌门 (Bacteroidetes)。拟杆菌门在病死大鲵皮肤样 (8~10 号) 菌群中同样是优势菌。由于无法解剖健康大鲵获取肝脏和肠道组织，因此肝脏和肠道样本仅限于病死大鲵，虽然缺少健康大鲵的肝脏和肠道微生物组数据，但我们仍然可以发现，在病死大鲵皮肤 (8~10 号) 和水样 (4~6 号) 中占据优势的拟杆菌门在

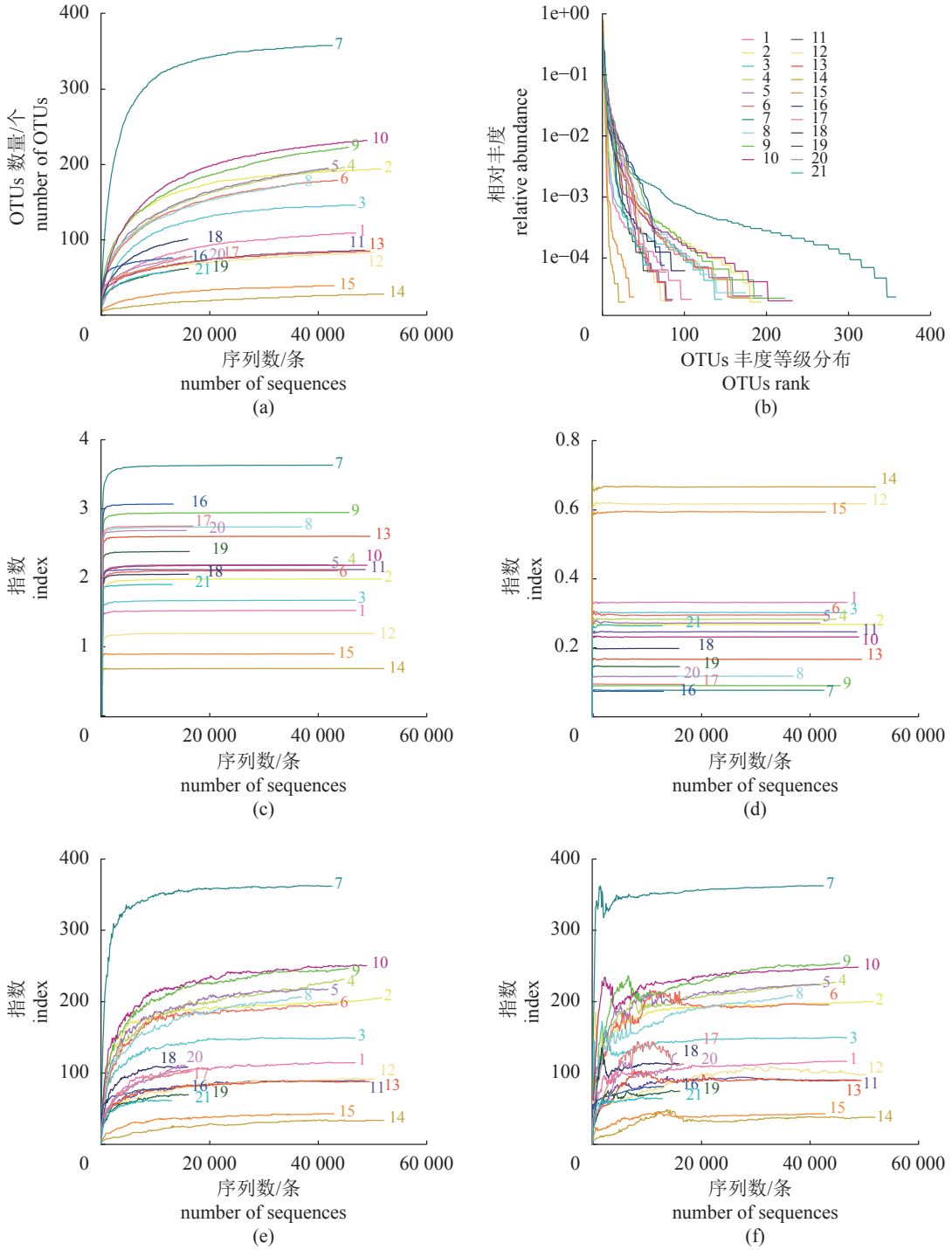


图 2　大鲵各样本 OTUs 分布及物种信息

(a) 大鲵微生物样本的 OTU 稀释曲线；(b) 大鲵微生物样本的丰度等级图；(c) 大鲵微生物样本 Shannon-Wiener 指数图；(d) 大鲵微生物样本 Simpson 指数图；(e) 大鲵微生物样本 Chao1 指数图；(f) 大鲵微生物样本 ACE 指数图

Fig. 2　OTUs distribution and species information of samples of *A. davidianus*

(a) multi sample rarefaction curves of *A. davidianus*; (b) OTU rank−abundance distribution curves of samples of *A. davidianus*; (c) Shannon-Wiener index curve of microorganism samples of *A. davidianus*; (d) Simpson index plot of microorganism samples of *A. davidianus*; (e) Chao1 index map of microorganism samples of *A. davidianus*; (f) ACE index diagram of microorganism samples of *A. davidianus*

病死大鲵的肝脏 (11~12 号) 和肠道 (13~15 号) 中占比极少，说明致病菌定殖的主要部位为宿主皮肤或者其他组织中，而非肝脏和肠道。同时，实验发现在健康大鲵皮肤中的优势菌群厚壁菌门

表 1 大鲵生物样本中微生物主要门类所占的平均比例

Tab. 1 Distribution of microorganism phyla in *A. davidianus* %

门 phylum		健康大鲵 healthy *A. davidianus*		患病大鲵 sick *A. davidianus*			
		生活水样 water sample	皮肤 skin	生活水样 water sample	皮肤 skin	肝脏 liver	肠道 intestine
变形菌门	Proteobacteria	85.37	16.63	29.97	93.19	90.95	99.66
拟杆菌门	Bacteroidetes	0.15	32.46	69.13	5.07	0.96	0.02
放线菌门	Actinobacteria	13.92	13.21	0.61	0.35	4.19	0.03
厚壁菌门	Firmicutes	0.45	32.24	0.17	1.21	3.09	0.92
栖热菌门	Deinococcus-Thermus	0	3.17	0	0.04	0	0
疣微菌门	Verrucomicrobia	0	2.18	0	0	0	0

(Firmicutes) 在感染致病菌后占比急剧下降，提示致病菌与厚壁菌门存在拮抗关系，厚壁菌门可能是开发大鲵益生菌的潜在目标菌 (图 3)。

在属水平上共鉴定到 53 个菌群 (>0.5%)，除了未分类的种群外，其中占 5% 以上的主要微生物种群有 9 个。分别是砷氧化菌属 (*Aliihoeflea*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、韩国丛毛单胞菌 (*Comamonas koreensis*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、产靛福格斯氏菌 (*Vogesella indigofera*)、乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和云南红球菌 (*Rhodococcus yunnanensis*) (图 4)。从水样相比，健康大鲵的生活水样中的优势菌群为砷氧化菌属，而病死大鲵的生活水样中优势菌群为金黄杆菌属，且金黄杆菌属在健康大鲵水样中几乎不存在，这表示金黄杆菌属可能是导致大鲵致病死亡的一个重要病原。从皮肤样本来看，金黄杆菌属仍然是病死大鲵皮肤样本中的主要菌群，但伯克氏菌属分别在 3 尾死亡的大鲵皮肤中大量存在，而在健康大鲵皮肤中没有发现。由此可以看出，当大鲵感染致病菌死亡后其皮肤中的优势菌群由砷氧化菌属和微小杆菌属变为金黄杆菌属和伯克氏菌属。

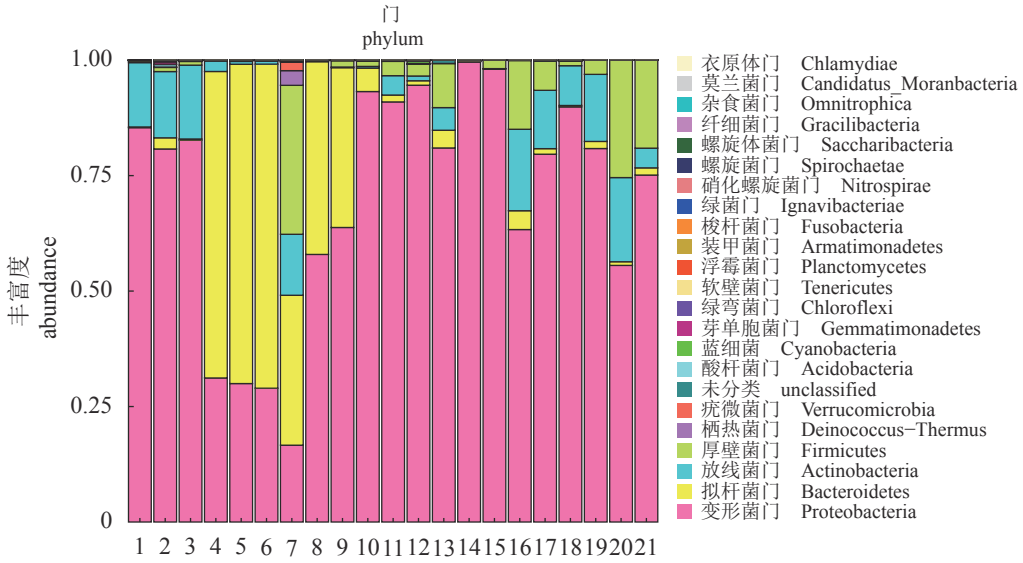


图 3 大鲵生物样本中微生物组在门水平上的物种组成重叠情况

1~3. 健康大鲵生活水样；4~6. 病死大鲵生活水样；7. 健康大鲵皮肤样本；8~10. 病死大鲵皮肤样本；11~12. 病死大鲵肝脏组织样本；13~15. 病死大鲵肠道组织样本；16~18. 抽提试剂空白对照；19~21. PCR 扩增体系空白对照；下同

Fig. 3 Phylum composition of the bacterial communities in *A. davidianus*

1-3. the living water sample of healthy *A. davidianu*; 4-6. the living water sample of dead *A. davidianu*; 7. the skin sample of healthy *A. davidianu*; 8-10. the skin sample of dead *A. davidianu*; 11-12. the liver tissue sample of dead *A. davidianu*; 13-15. the intestinal tissue sample of dead *A. davidianu*; 16-18. the blank control of extraction reagent; 19-21. the blank control of PCR amplification system; the same below

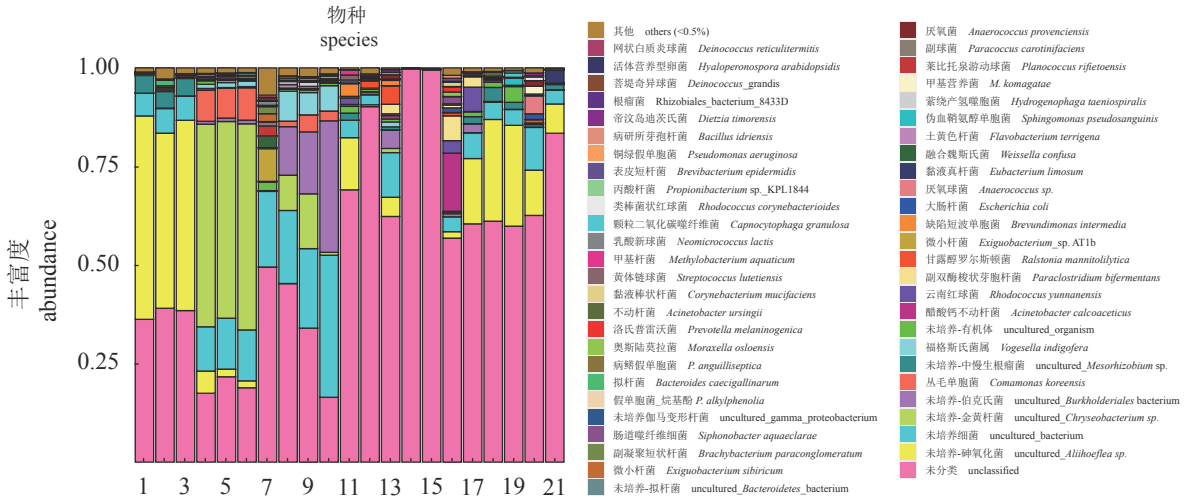


图 4　大鲵生物样本中微生物组在种水平上的物种组成重叠情况

Fig. 4　Associated microbiota of *A. davidianus* at species level

2.4　健康大鲵与病死大鲵皮肤微生物的菌群丰度差异分析

通过不同样本 OTU 数目相似性及重叠分析，可以找出各组之间的菌群丰度差异。从图 5 可以看出，在所有样本中，健康大鲵 (7 号) 的皮肤样本所包含的 OTU 数量最多，高达 358 个，而其独有的 OTU 同样是最多的，达 130 个。相比于 8~10 号样本，大鲵病死后皮肤样本中的 OTU 数量显著下降，且其独有的 OTU 低至 4 个。这可能是由于致病菌的感染极大降低了大鲵皮肤的微生物区系丰度，其中主要缺失的微生物组是健康大鲵独有的微生物区系。

种水平样品聚类树与柱状图组合分析图结果显示，所有样本的微生物主要聚类为两大分支，患病大鲵的水样和皮肤样本聚为一支 (图 6-a)，健康大鲵的水样和皮肤样本以及肠道和肝脏等样本聚为一支，说明患病大鲵和健康大鲵的皮肤微生物组差异明显，并且病原菌并未显著感染肠道和肝脏。从图 6-a 还可以看出，金黄杆菌属、伯克氏菌属、韩国丛毛单胞菌等条件致病菌在患病大鲵中的丰度明显高于健康大鲵，说明患病大鲵中致病微生物的含量更高。从图 6-b 可以看出，在这些条件致病菌中，韩国丛毛单胞菌、伯克氏菌属和乙酸钙不动杆菌在丰度相似性上聚为一类，而砷氧化菌属和中慢生根瘤菌属等益生菌则聚为一类。可见，健康大鲵和患病大鲵在微生物丰度标记类群存在一定的差异，这可能与致病菌的感染和大鲵水生环境有关。

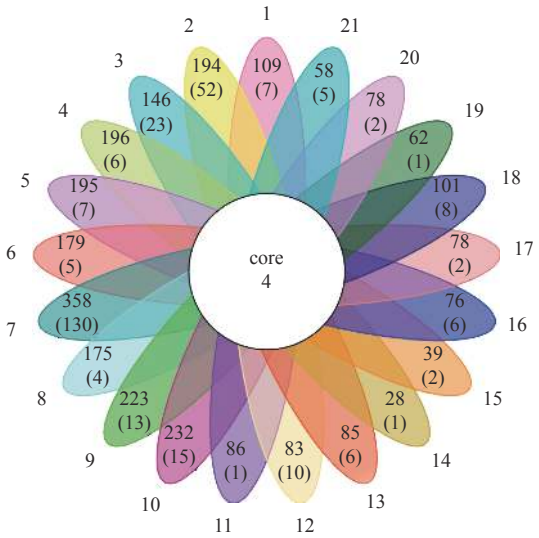


图 5　大鲵生物样本中微生物组丰度差异韦恩图

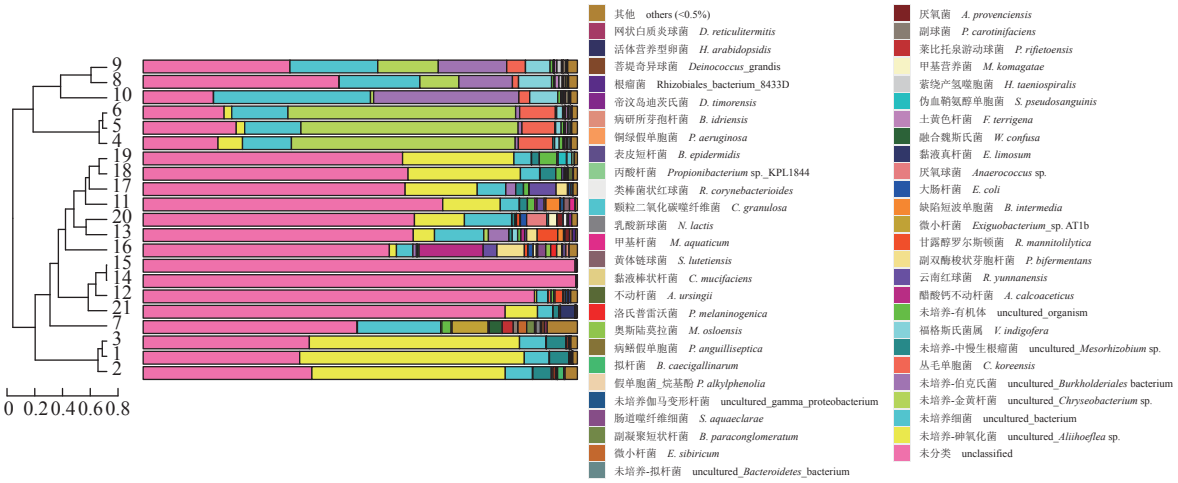
最外圈为样本名称；花瓣中包括 2 行数字，上面为每个样本包含的所有 OTU 数量，下面括号中为每个样本独有 (unique) 的 OTU 数量；中间的白色圈为核心 OTU 数量

Fig. 5　Venn diagram of microbiome abundance difference in biological samples of *A. davidianus*

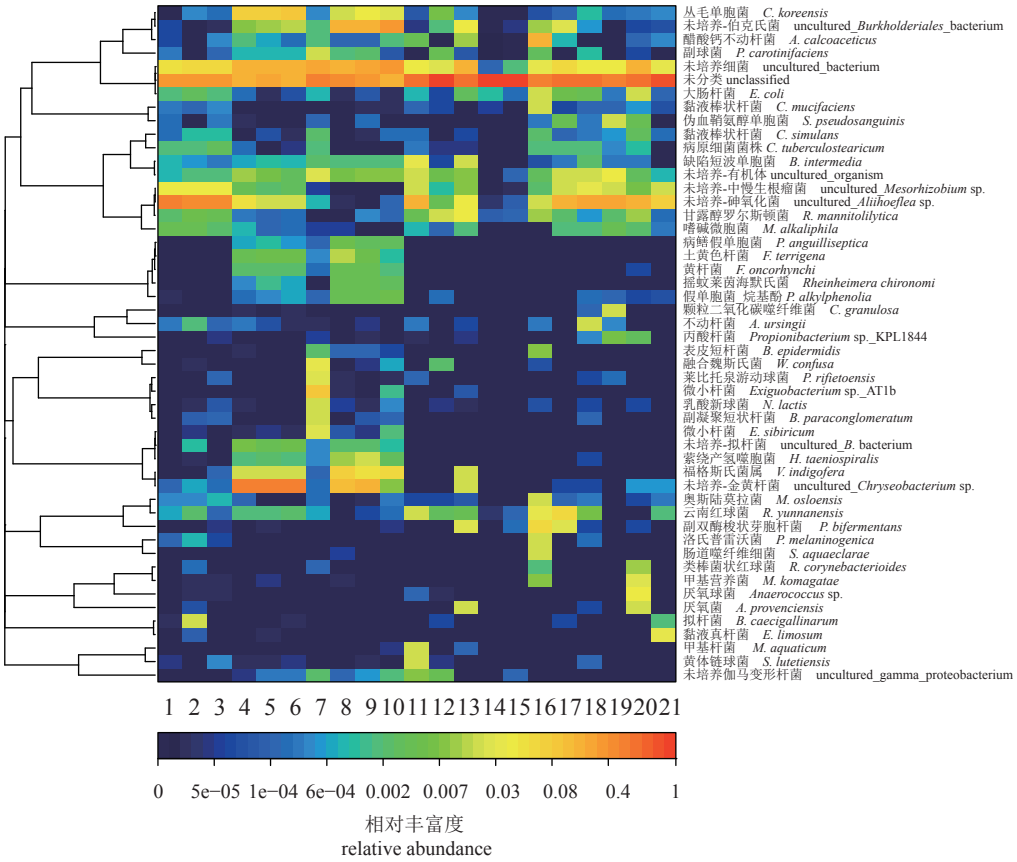
The outermost ring is the sample name; the petals contain two rows of numbers, with the number of OTUs contained in each sample on the top and the number of OTUs unique to each sample in the parentheses below; the white circle in the middle is the core OTU number

3　讨论

大鲵是我国非常珍贵的野生动物。到目前为止，基于高通量测序探索微生物区系与大鲵患病致死的关系研究较少，且为数不多的研究集中于大鲵肠道微生物组的多样性分析[15]。对于水生动



(a)



(b)

图 6 大鲵生物样本中微生物组聚类分析

(a) 种水平样品聚类树与柱状图组合分析图；(b) 微生物样本在种水平上的物种表达谱热图

Fig. 6 Clustering analysis of microbiome in biological samples of *A. davidianus*

(a) combined analysis diagram of cluster tree and histogram of samples at the species level; (b) species expression spectrum heat map of microbial samples at species level

物而言，皮肤感染后导致的微生物区系改变与肠道及内脏感染同样重要[16]。本研究首次对大鲵患病前后皮肤微生物区系及其功能进行研究。结果表明，与健康大鲵相比，溃疡致死的大鲵具有完全不同的皮肤微生物区系。

本研究结果表明，健康大鲵的皮肤微生物比

患病大鲵更丰富，类似的结果已在大鲵肠道微生物区系和脏器微生物区系研究中证实[15]。这可能与大鲵的疾病感染有关，因为致病菌往往会分泌毒力蛋白允许细菌逃避宿主的防御，并破坏宿主细胞进程，使之成为感染后的优势菌群，导致疾病发生[17]。在门水平丰度方面，放线菌门和厚壁菌门在健康大鲵样本中为主要优势菌群，这也与先前的水生动物中发现的结果一致[18]。同时，患病大鲵的厚壁菌门相对丰度显著低于健康大鲵 (P<0.05) (图 3)。皮肤和黏膜构成了大鲵防卫的第一道防线，已知厚壁菌门有助于皮肤中碳水化合物和/或蛋白质的发酵产生活性物质，帮助宿主抵抗病原菌的入侵[19]。同时，厚壁菌门还可以分解角质细胞的碎屑或脂质，维持表皮酸性环境，抑制条件致病菌的入侵[20]。此外，有研究报道厚壁菌门还与肠道内热量吸收有关，厚壁菌门越丰富越容易肥胖[21]。因此，在患病大鲵皮肤中厚壁菌门丰度的显著下降代表着大鲵的抗菌能力减弱，进而影响宿主免疫。除此之外，患病大鲵中金黄杆菌属和伯克氏菌属也呈上升趋势。许多金黄杆菌属被报道可能引起外源性感染，导致宿主免疫力低下，严重的可引起肺炎、脑膜炎及败血症等[22]。值得注意的是，Loudon 等[23] 最近报道了金黄杆菌属与两栖动物类动物抑制蛙壶菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) 的感染呈负相关，这与我们研究患病大鲵的皮肤中金黄杆菌属与致病菌伯克氏菌属丰度同时上升的结果一致 (图 4)。因此，金黄杆菌属可能参与了大鲵皮肤患病，但是是直接引起溃疡，还是为伯克氏菌属的感染提供有利条件还需要进一步研究。实验发现，在患病大鲵皮肤中上升最显著的是伯克氏菌属，该菌属广泛存在于自然环境中的水、土壤等，具有较强的致病性[24]。感染伯克氏菌常见的症状有皮肤脓肿或溃疡，这与本研究中患病大鲵的病症表现相符，严重的还会引起内脏脓肿和全身性神经麻痹，是危害性较大的人兽共患病原菌[25]。Ellison 等[26] 发现，在发生皮肤溃疡致死的青蛙皮肤微生物中超过 90% 的 DNA序列来自伯克氏菌属。综上，条件致病菌的上调表明大鲵皮肤微生物的平衡被破坏，从而导致溃疡性皮肤病发生。

本研究首次在致病菌感染死亡的中华大鲵皮肤中发现伯克氏菌属，这可能是导致大鲵死亡的重要病原菌，但仍需要进一步的研究。值得注意的是金黄杆菌和伯克氏菌的绝对定量显示，其在病死大鲵的生活水样中的量要远高于病死大鲵皮肤样本中的量，而在健康大鲵的生活水样和皮肤样本中几乎检测不到这 2 种致病菌的存在，这说明这些病原菌感染健康大鲵的途径极有可能是通过水源感染的。这说明在大鲵养殖过程中，水源的可靠度极其重要。同样的，要保护自然环境中的野生大鲵，它们生活的水域也应该受到良好的保护。

综上所述，通过高通量测序比较健康大鲵和病死大鲵皮肤和水样菌群的组成，可以发现，当大鲵感染溃疡时，优势菌群的丰度发生了显著转移。放线菌门和厚壁菌门显著降低 ($P < 0.05$)，而拟杆菌门和变形菌门显著升高 ($P < 0.05$)。在属水平上，患病大鲵未检出砷氧化菌，而一些致病细菌，如金黄杆菌、伯克氏菌和韩国丛毛单胞菌，则显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明，金黄杆菌和伯克氏菌可能是引起大鲵皮肤溃疡的重要潜在病原体。此外，一些“健康核心”细菌如砷氧化菌属和厚壁菌门的丰度降低也可能是致病因素之一。研究结果对中华大鲵的保护以及对皮肤菌病大鲵的皮肤菌群生态的理解有重要的意义，这将有助于优化养殖和改善中华大鲵的健康。

（作者声明本文无实际或潜在的利益冲突）

参考文献 (References)：

[1] Turvey S T, Marr M M, Barnes I, *et al*. Historical museum collections clarify the evolutionary history of cryptic species radiation in the world's largest amphibians[J]. Ecology and Evolution, 2019, 9(18): 10070-10084.

[2] Pei J J, Jiang L. Antimicrobial peptide from mucus of *Andrias davidianus*: screening and purification by magnetic cell membrane separation technique[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 50(1): 41-46.

[3] Pei J, Chen D, Jin W, *et al*. Structure and mode of action of a novel antibacterial peptide from the blood of *Andrias davidianus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 69(5): 312-317.

[4] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, *et al*. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*)[J]. Journal of Comparative Pathology, 2011, 145(1): 95-102.

[5] 张晗, 邓捷, 赵虎, 等. 大鲵细菌性疾病研究进展[J]. 河北渔业, 2020(3): 50-56,62.
Zhang H, Deng J, Zhao H, *et al*. Research progress on bacterial disease of Chinese giant salamander[J]. Hebei Fisheries, 2020(3): 50-56,62 (in Chinese).

[6] Luo Q H, Tong F, Song Y J, *et al*. Observation of the breeding behavior of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) using a digital monitoring system[J]. Animals, 2018, 8(10): 161.

[7] 陶峰勇, 王小明, 章克家. 大鲵栖息地环境的初步研究[J]. 四川动物, 2004, 23(2): 83-87.
Tao F Y, Wang X M, Zhang K J. Preliminary study on characters of habitat dens and river types of Chinese giant salamander[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2004, 23(2): 83-87 (in Chinese).

[8] Wu Z B, Gatesoupe F J, Zhang Q Q, *et al*. High-throughput sequencing reveals the gut and lung prokaryotic community profiles of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(5): 5143-5154.

[9] Holz C, Benning J, Schaudt M, *et al*. Novel bioactive from *Lactobacillus brevis* DSM17250 to stimulate the growth of *Staphylococcus epidermidis*: a pilot study[J]. Beneficial Microbes, 2017, 8(1): 121-131.

[10] Rintala A, Pietilä S, Munukka E, *et al*. Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16S *rRNA* gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor[J]. Journal of Biomolecular Techniques, 2017, 28(1): 19-30.

[11] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.

[12] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[13] Wen C Q, Wu L Y, Qin Y J, *et al*. Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176716.

[14] Brattgjerd S, Evensen Ø. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Veterinary Pathology, 1996, 33(1): 55-65.

[15] 兰阿峰, 郭素芬, 彭浩, 等. 养殖大鲵肠道细菌多样性[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 146-151.
Lan A F, Guo S F, Peng H, *et al*. Analysis of intestinal bacterial diversity of cultured Chinese giant salamander[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(1): 146-151 (in Chinese).

[16] Reinhart E M, Korry B J, Rowan-Nash A D, *et al*. Defining the distinct skin and gut microbiomes of the Northern Pike (*Esox lucius*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2118.

[17] Noroy C, Meyer D F. Comparative genomics of the zoonotic pathogen *Ehrlichia chaffeensis* reveals candidate type IV effectors and putative host cell targets[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 6: 204.

[18] Stincone P, Brandelli A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(3): 306-319.

[19] Huang H Y, Zhou P J, Chen P, *et al*. Alteration of the gut microbiome and immune factors of grass carp infected with *Aeromonas veronii* and screening of an antagonistic bacterial strain (*Streptomyces flavotricini*)[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 143: 104092.

[20] Li W F, Yang H Y, Zhao Q, *et al*. Polyphenol-rich loquat fruit extract prevents fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease by modulating glycometabolism, lipometabolism, oxidative stress, inflammation, intestinal barrier, and gut microbiota in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(27): 7726-7737.

[21] 王欢, 李宛真, 汪弋力, 等. 高脂饮食诱导的肥胖及肥胖抵抗小鼠肠道菌群元基因组的比较研究[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(2): 240-244.
Wang H, Li W Z, Wang G L, *et al*. Comparison of the gut microbiome metagenome in diet-induced obesity mice and diet-induced obesity resistant mice[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2014, 35(2): 240-244 (in Chinese).

[22] Mukerji R, Kakarala R, Smith S J, *et al*. *Chryseobacterium indologenes*: an emerging infection in the USA[J]. BMJ Case Reports, 2016, 2016: bcr-2016-214486.

[23] Loudon A H, Kurtz A, Esposito E, *et al*. Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) have characteristic skin microbiota that may be shaped by cutaneous skin peptides and the environment[J]. FEMS Microbiology Eco-

logy, 2020, 96(10): fiaa168.

[24] Shaw J L A, Monis P, Weyrich L S, *et al*. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(18): 6463-6473.

[25] Lafontaine E R, Zimmerman S M, Shaffer T L, *et al*. Use of a safe, reproducible, and rapid aerosol delivery method to study infection by *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76804.

[26] Ellison S, Knapp R A, Sparagon W, *et al*. Reduced skin bacterial diversity correlates with increased pathogen infection intensity in an endangered amphibian host[J]. Molecular Ecology, 2019, 28(1): 127-140.

Diversity of microflora involved in skin ulcer and death of *Andrias davidianus*

XU Junqi [1], XIE Jianping [2], WANG Zhijian [1*]

(1. *Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development*, *Ministry of Education*, *Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing*, *School of Life Sciences*, *Southwest University*, *Chongqing* 400715, *China*;

2. *State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environment and Bio-Resource of the Three Gorges Area*, *Institute of Modern Biopharmaceuticals*, *School of Life Sciences*, *Southwest University*, *Beibei*, *Chongqing* 400715, *China*)

Abstract: To explore the dynamics of microflora on diseased and healthy skin or in water samples of *Andrias davidianus* in natural environment, and provide microbial basis for rational aquaculture, protection of wild *A. davidianus* and future development of probiotics to improve the breeding of *A. davidianus*, in this study, the skin microflora of *A. davidianus* were profiled by high-throughput sequencing of the V4-V5 region of 16S *rDNA* gene, and the changes of skin microflora were compared between the healthy and the diseased *A. davidianus*. There were significant differences in the diversity, structure and function between healthy and diseased *A. davidianus* skin bacteria.The average number of Tag of each sample was 97 150, and the average length of sequencing was 400 bp. The OTU data showed that the microbial abundance of healthy skin was much higher than that of diseased skin. The dominant bacterium in the living water samples of healthy *A. davidianus* was *Aliihoeflea*, and after *A. davidianus* died, it changed to *Chryseobacterium*. The abundance of *Chryseobacterium*, *Comamonas* and *Burkholderiales* increased significantly, while that of *Aliihoeflea*, *Exiguobacterium* and *Planococcus rifietoensis* decreased significantly ($P<0.05$). Meanwhile, the skin surface of the dead *Andrias davidianus* had a large number of ulcers with pili, with typical symptoms of *Burkella* infection. Our findings confirmed that there were significant differences in skin microflora of dead and diseased *A. davidianus*. *Burkella* zoonotic bacteria might be the main cause of the death of *A. davidianus* in natural environment contaminated by water vector. This provided a basis for scientific breeding of *A. davidianus*.

Key words: *Andrias davidianus*; pathogen; community structure; 16S *rDNA*

Corresponding author: WANG Zhijian. E-mail: wangzj1969@126.com

Funding projects: National Key Research and Development Plan (2016YFC0502304); 2020 Chongqing Postdoctoral Research Project (7820100597)