

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15255

南美白对虾养殖环境及其肠道细菌多样性分析

孙振丽¹, 宣引明², 张皓¹, 蒋明², 潘云生², 张益明², 龚叶平², 陆小平²,
余德山², 薛仁宇¹, 胡小龙¹, 曹广力¹, 贡成良¹

1. 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123;

2. 昆山市水产技术推广站, 江苏 苏州 215300

摘要: 为了探讨南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone)肠道及其养殖环境中细菌种群组成和分布, 采用 Illumina miseq 测序平台, 基于 16S rRNA 基因的序列测定结果, 对南美白对虾肠道及其养殖池塘底泥、水体中细菌的种群结构进行分析。结果显示, 在南美白对虾肠道、养殖池塘底泥、水体分别检测到 206、265 和 270 个细菌属, 其中有 90 个属在 3 个样品中均可检测到, 底泥和水、底泥和虾肠道、水和虾肠道中检测到的共有细菌属分别为 146、128 和 119 个, 表明养殖池塘底泥、水和肠道中细菌存在密切的相互作用。在底泥、水和虾肠道样品中丰度大于 1% 的优势菌属分别有 20、17 和 10 个; 底泥、水体和虾肠道中丰度最高的细菌均为一种分类未明的细菌属, 丰度分别为 23.08%、37.13% 和 42.22%。除此之外, 底泥中主要优势细菌属分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*)(5.77%)、*Ohtaekwangia*(4.79%) 和狭义的梭菌属(*Clostridium*)(3.88%); 水体中主要优势细菌属分别为土壤杆菌属(*Sediminibacterium*)(6.64%)、*Spartobacteria genera incertae sedis* (3.95%) 和 GPIIa(3.20%), 而虾肠道中主要优势细菌属分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*)(14.57%) 和不动杆菌属(*Acinetobacter*)(6.54%)。在底泥、水和肠道中分别检测到 3、6 和 6 个潜在致病细菌属, 丰度最高的细菌属分别是假单胞菌属 (5.77%)、黄杆菌属(*Flavobacterium*) (0.77%) 和假单胞菌属(14.57%)。在底泥、水和肠道中检测到的益生菌可分别分配至 8、6 和 7 个细菌属, 其中有 5 个属在 3 个样品中均可检测到。聚类分析显示, 养殖池塘底泥、水体和南美白对虾肠道细菌种群中丰富度位于前 20 的分类操作单元(OUT)在聚类树的位置存在明显不同。研究结果进一步加深了对健康南美白对虾肠道细菌种群及其与养殖环境中细菌种群互作的理解, 为益生菌制剂的研发提供了新的线索。

关键词: 南美白对虾; 养殖水体; 底泥; 肠道; 细菌种群

中图分类号: S966

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0594-12

南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone)是三大养殖对虾中单产量最高的虾种。随着水产养殖业集约化及规模化发展, 抗生素和化学药物的滥用使水生动物免疫力降低、对疾病的易感性增加, 从而导致大规模病害的频繁发生。稳定的肠道菌群结构是水生动物健康生长的必需条件, 抗生素及化学药物的大量使用不仅会破坏肠道细菌群落组成, 导致肠道微生态失衡, 而且还会导致病原微生物产生耐药性和药物残留。在养殖水体中施用

微生态剂可改善养殖生态环境、提高水生动物的抗性、抑制病原微生物, 从而减少疾病的发生^[1-2]。微生态剂往往通过改善肠道菌群结构而发挥作用, 因此研究水生动物肠道正常细菌群落结构是微生态制剂开发的必要先决条件。正常的肠道细菌有利于动物对营养物质的消化吸收及对疾病的抗性, 其固有的细菌区系与其生存环境、健康状态紧密相关。Yasuda 等^[3]的调查发现, 野生日本对虾与喂养日本对虾的肠道细菌区系间存在共有的

收稿日期: 2015-06-28; 修订日期: 2015-09-20.

基金项目: 江苏省水产三新工程项目(D2013-5-3, D2015-12).

作者简介: 孙振丽(1990-), 女, 硕士研究生. E-mail: zhenlisun@163.com

通信作者: 贡成良, 教授, 博士生导师. E-mail: gongcl@suda.edu.cn

细菌种类,有相似的菌群结构。软体动物、环节动物、节肢动物和棘皮动物等水生动物体内也存在固有的细菌群落^[4]。Gatesoupe^[5]认为,健康动物中的正常优势菌可作为益生菌的来源。

宛立等^[6]通过分离纯化培养法,从健康南美白对虾肠道中检测到了 111 株细菌,但一些难以培养的优势菌种或低丰度菌种则检测不出,因此研究结果不能全面地反映南美白对虾肠道微生物的种群数量及多样性。李可等^[7]通过 16S rDNA 克隆文库法对实验室养殖条件下的南美白对虾肠道细菌进行了多样性研究,共检测到 12 种细菌,其中,厚壁细菌(Firmicutes)和变形细菌(Proteobacteria)为优势菌,各占 75.4%和 24.6%。刘淮德等^[8]利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术在南美白对虾肠道中检测到了 12 种细菌。

高通量测序技术具有速度快、通量大、精度高等特点,已成为研究肠道细菌群落的主要研究技术。养殖池塘的水环境及底泥环境中微生物的多样性时刻影响着南美白对虾肠道菌群结构,而以往的研究大多局限于单一的水样、泥样或者动物肠道。基于此,本研究采用 Illumina miseq 测序平台对南美白对虾肠道细菌、养殖水体及其养殖池塘底泥细菌进行 16S rRNA 基因序列测定,期望能较全面反映南美白对虾肠道细菌种群结构组成及其丰度,进一步理解养殖环境微生物对肠道微生物的影响,为南美白对虾微生态制剂的开发提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2014 年 6 月 24 日于昆山市锦溪水产良种有限公司(30°21'N-120°88'E)的南美白对虾养殖池塘(面积: 0.74 hm²,水深: 1.7~2 m)中采集健康南美白对虾,充氧运输至实验室后,在无菌环境下对体表进行消毒,解剖,收集 5 尾虾(11 cm, 7.0 g; 10 cm, 5.2 g; 11 cm, 7.3 g; 12.5 cm, 11.3 g; 12.5 cm, 10.7 g)的肠道内容物作为一个样品,立即-80℃保存。同时采集该池塘的水样(离岸 5 m、距离水面 0.5 m)和底泥(水底表层 5 cm)。采集的底泥作为一

个样品,于-80℃冰箱冷冻保存。取 3 L 水样用尼龙网袋(TPE-200 目-03A,上海恒泰过滤设备有限公司)过滤,滤液进一步用混合纤维膜(孔径 0.45 μm,上海新亚净化器件厂)过滤,滤膜于-80℃冰箱保存备用。

1.2 水质测定

养殖池塘水质的测定,按 GB/T 6920—1986 方法用 pH 计(梅特勒-托利多,FE20K)测定 pH 值,用 MERCK 公司的检测试剂盒按产品说明书检测水的化学需氧量(COD)、亚硝酸盐、氨氮、总氮、总磷水平。

1.3 样品总 DNA 的提取、PCR 扩增纯化及序列测定

分别取南美白对虾肠道内容物、水样滤膜和 1 g 湿重泥样各 1 个样品,用 E.Z.N.A. Soil DNA Kit (Omega Biotek 公司, D5625-01)按产品说明书抽提样品的总基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的 DNA 质量,用分光光度计(Qubit® 2.0 fluorometer)测定 DNA 浓度后,调节质量浓度至 10 ng/μL。利用 16S rRNA 基因具有保守序列的特点,用通用引物(MSQ341F-91: CCTACACGAC GCTCTTCCGATCTN (barcode) CCTACGGGNGG CWGCAG, Miseq-805R: GACTGGATTCTTGGC ACCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAA TCC)扩增 16S rRNA 基因的 V1~V3 区。扩增在 50 μL 体系中进行,包括 10 ng DNA, 5 μL 10× PCR buffer, 0.5 μL dNTPs (10 mmol/L), 0.5 μL Plantium Taq (5 U/μL), 0.5 μL V1F (50 μmol/L), 0.5 μL V3R2 (50 μmol/L); PCR 扩增条件为 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 5 个循环; 45℃, 20 s; 65℃, 30 s; 94℃, 20 s, 20 个循环; 55℃, 20 s; 72℃, 30 s; 最后 72℃, 5 min。

扩增产物经过定量后,将 DNA 浓度调节至 25 ng/μL,所有样品按照 1:1 混匀后,用 Illumina miseq 测序平台进行建库与测序(委托中国苏州贝斯派生物科技有限公司完成)。

1.4 数据分析

根据引物上 barcode 序列区分样品,使数据回归样品^[9]。将原数据利用 LUCY (version 1.2)软件以滑窗法去除低质量数据^[10],保留长度≥50 bp

的序列; 采用 Uchime 软件以 silva 数据库中的序列作为模板去除嵌合体。将相似性达 97% 的序列归为一个分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs), 利用核糖体数据库分类器 (ribosomal database project, RDP) 将代表 OTUs 的序列分类至属水平^[11]。物种丰富度通过稀疏曲线、Alpha 多样性 (Chao1 指数, ACE 指数) 分析进行评价, 物种多样性用 Shannon-Wiener 多样性指数评价^[12]。维恩分析通过在线软件 ([\[formatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/\]\(http://formatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/\)\) 进行; 柱状图运用 Origin 软件制作; 系统进化树由 Mega6.06 软件包中的 Neighbor-Joining 程序构建。](http://bioin-</p></div><div data-bbox=)

2 结果与分析

2.1 水质情况

在本研究中我们测定了采样时间点 (2014 年 6 月 24 日) 的水质 (表 1), 结果显示, 各个指标都处在正常范围内。

表 1 采样地点水质指标
Tab. 1 Quality indexes of sampled water

养殖品种 aquaculture species	面积 /hm ² square meter	pH	水温/℃ temperature of water	亚硝酸盐 /(mg·mL ⁻¹) nitrate	氨氮 /(mg·mL ⁻¹) nitrogen ammonia	硫化物 /(mg·mL ⁻¹) sulphide	总氮 /(mg·mL ⁻¹) total nitrogen	总磷 /(mg·mL ⁻¹) total phosphorus	COD/(mg·mL ⁻¹) chemical oxy- gen demand
南美白对虾 <i>Penaeus van-</i> <i>namei</i> Boone	0.74	8.73	30.4	0.034	0.015	0.052	1.3	0.18	10

2.2 样品细菌群落丰富度和多样性分析

从样品多样性指数 (表 2) 中看出, 水体样品的 ACE 指数和 Chao1 指数高于底泥样品和南美白对虾肠道样品, 说明水、底泥和南美白对虾肠道的

细菌菌群丰富度依次降低。底泥、水、南美白对虾肠道中细菌菌群 Shannon 指数依次减小, 说明其细菌种群多样性依次降低, 底泥中细菌多样性最丰富。

表 2 各样品多样性指数
Tab. 2 Diversity indexes of each sample

样品 sample	Shannon 指数 Shannon index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index
SS	6.04	4935.82	2650.84
WS	5.95	10161.04	5313.15
PB	4.28	3001.92	1694.40

SS: 底泥样品; WS: 水体样品; PB: 南美白对虾肠道样品。
SS: sediment sample; WS: water sample; PB: *Penaeus vannamei* Boone intestinal sample.

2.3 南美白对虾肠道和养殖环境细菌群落组成及结构

2014 年 6 月 24 日采集的南美白对虾养殖池塘中的底泥样品、水体样品及南美白对虾肠道样品用 Illumina miseq 测序技术对细菌宏基因组进行 16S rRNA 基因序列测定。去除低质量序列后, 在底泥、水和虾肠道样品中分别获得 2860、11550 和 5135 个 reads, 将相似性达 97% 的序列归为分类操作单元 OTUs 后, 利用 RDP 分类器对检测到的细菌进行分类。结果如表 3 所示, 同一池塘同

一时间点的底泥、水及虾肠道中的细菌菌群存在一定的差异, 水样中获得的有效 reads 数及 OTUs 数量明显多于泥样及虾肠道样品, 但底泥样品中的细菌分类到门、纲和目的种类都多于水样及虾肠道样品, 虾肠道细菌多样性低于底泥和水体的细菌多样性。

南美白对虾肠道细菌种群结构与养殖环境有密切的关联。在门的水平上, 底泥、水和对虾肠道中检测到的细菌属分别分类到 24、19 和 17 个门, 其中, 17 个门在 3 种样品中均存在 (图 1a), 硝

表 3 底泥(SS)、水体(WS)及南美白对虾肠道(PB)细菌菌群的基本构成

Tab. 3 Composition of bacterial communities in sediment(SS), water(WS) and gut of *Penaeus vannamei* Boone (PB)

样品 sample	有效 reads 读数 valid reads	门 hylum	纲 class	目 order	科 family	属 genus	分类单元 taxon (OTUs)
SS	2860	24	44	59	109	265	1051
WS	11550	19	37	57	110	270	2036
PB	5135	17	36	50	92	206	727

化螺菌门(Nitrospira)、泉古菌门(Crenarchaeota)、Elusimicrobia、OP11、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)和 WS3 等 6 个门的菌只能在底泥中检测到; 栖热菌门(Deinococcus-Thermus)仅在水样中检测到,除了 3 个样品共有的 17 个门的细菌外,装甲菌门(Armatimonadetes)在底泥和水样品中可同时检测到,但在底泥或水样中单独检测到的细菌在该样品细菌群落中并不占优势。3 个样品中共有的 17 个门在底泥、水、虾肠道细菌种群中所占比例存在较明显的差异(图 1b)。底泥中, 占比前三位的细菌门分别是变形菌门(Proteobacteria)(41.6%)、拟杆菌门(Bacteroidetes)(24.44%)和厚壁菌门(Firmicutes)(9.09%); 在水样中, 占比前三位的细菌门分别是拟杆菌门(25.36%)、放线菌门(Actinobacteria)(23.79%)和变形菌门(Proteobacteria)(22.94%); 在虾肠道中, 占比前三位的细菌门分别是变形菌门

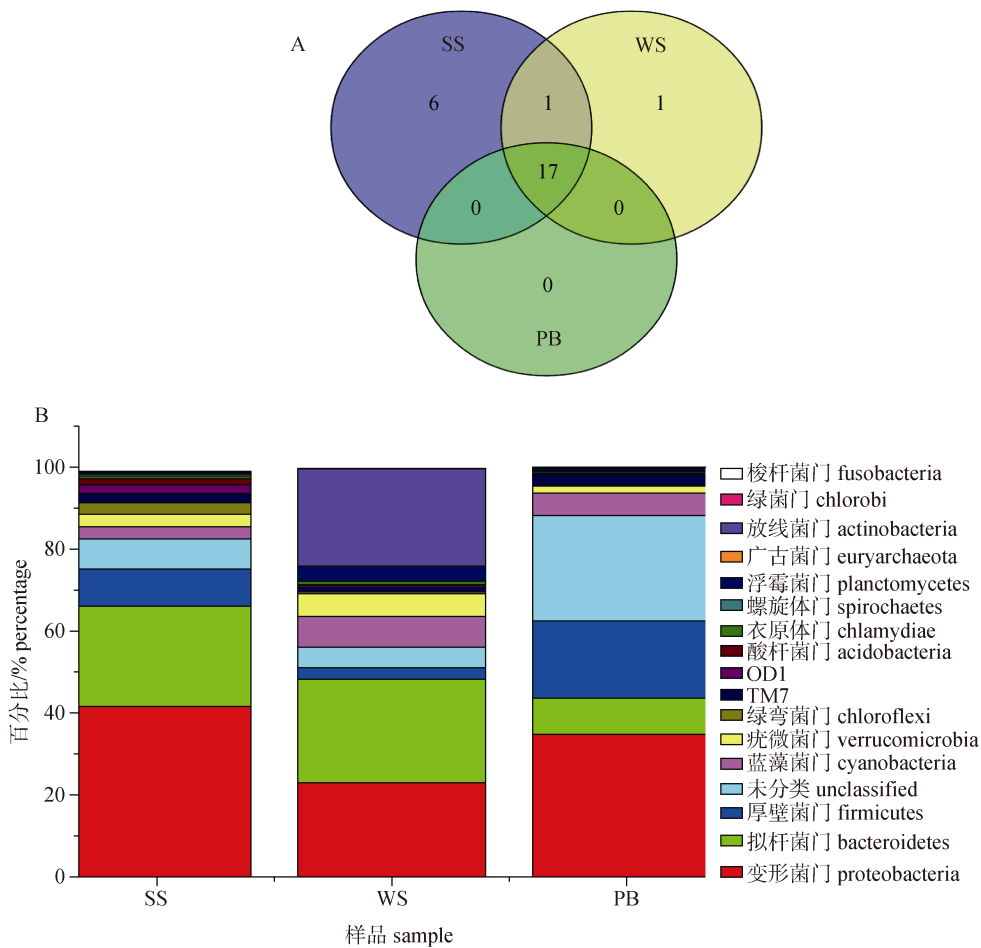


图 1 底泥、水体和南美白对虾肠道中细菌种群在门水平上的结构与分布

A. 底泥(SS)、水体(WS)和南美白对虾肠道(PB)中细菌门的 venn 分析; B. 3 个样品中共检测到的 17 个细菌门在各样品中的占比.

Fig. 1 Structure and distribution of bacterial communities at the phylum level in sediment, water and gut of *Penaeus vannamei* Boone

A. Veen analysis of bacteria at phylum level in sediment (SS), water (WS) and *Penaeus vannamei* Boone intestine (PB); B. Percent-ages of all 17 phyla in each sample.

(34.80%)、一种未分类菌门(25.74%)和厚壁菌门(18.89%)。在 3 个样品中都大于 1% 的门有变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、一种未分类菌门、蓝藻菌门(Cyanobacteria/Chloroplast)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和 TM7, 除此之外, 底泥中绿弯菌门(Chloroflexi)、OD1 和酸杆菌门(Acidobacteria)的比例也高于 1%; 水样中浮霉菌门(Planctomycetes)和酸杆菌门(Actinobacteria)的比例也高于 1%。

在纲的水平上, 底泥样品、水样品、南美白对虾肠道样品中分别检测到 44、37、36 个纲, 底泥和水中检测到 34 个相同纲, 底泥和虾肠道中检测到 35 个相同纲, 而水和虾肠道共检测到 33 个相同纲, 有 32 个纲在 3 个样品中可同时检测到; 在目的水平上, 底泥、水、虾肠道中分别检测到 59、57、50 个目, 47 个目在底泥和水体中均可检测到, 45 个目在底泥和虾肠道中同时检测到, 46 个目在水和虾肠道中同时检测到, 3 种样品中都能检测到的细菌有 41 个目; 在属的水平上, 底泥、水和虾肠道中分别检测到 265、270 和 206 个属, 其中, 有 90 个属在 3 个样品中均可检测到, 底泥和水、底泥和虾肠道、水和虾肠道中同时检测到的细菌属分别为 146、128 和 119 个(图 2)。

在属水平上, 将样品中占比>1% 的细菌属定义为样品的优势菌属。在各样品中, 各优势菌组

成和比例如图 3 所示, 3 种样品中优势菌属的构成及所占比例有明显不同, 在底泥、水和虾肠道样品中优势菌分别有 20、17 和 10 个属。在底泥、水和虾肠道中的共同优势菌并不多, 3 个样品中共有的优势菌属及其在底泥、水和虾肠道中细菌的比例分别为一种未定名细菌属(23.08%, 37.13%, 42.22%)和 TM7(2.24%, 1.03%, 2.57%); 除此之外, 在底泥和水中未检测到其他共有的优势菌属; 在底泥和虾肠道中还检测到 2 种共有优势菌属, 其中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)占底泥和虾肠道中细菌的比例分别为 5.77%和 14.57%, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)分别为 1.26%和 6.54%; 在水和虾肠道中还可检测到 2 种共有优势菌属土壤杆菌属 *Sediminibacterium* 和 *Spartobacteria*, *Sediminibacterium* (*Spartobacteria*)在水和虾肠道中所占比例分别为 6.64% (3.95%)和 3.70% (1.42%)。3 个样品中, 占比最大的细菌属均是一种未分类到属的细菌, 在底泥样品中占比其次的是假单胞菌属(5.77%)和 *Ohtaekwangia*(4.79%); 在水样品中占比其次的细菌为土壤杆菌属(*Sediminibacterium*) (6.64%)、*Spartobacteria*(3.95%); 在对虾肠道中占比其次的是假单胞菌属(14.57%)和不动杆菌属(6.54%)。3 个样品的细菌种群在属水平上的组成和分布说明, 在同一养殖池塘中底泥、水体、肠道中细菌菌群组成有密切的关联。

2.4 养殖水体及南美白对虾肠道中的益生菌和致病菌

养殖环境及南美白对虾肠道的益生菌、潜在致病菌的构成及比例对养殖水体的水质、南美白对虾对营养物质的消化吸收及其抗病性有非常重要的作用。本研究的调查结果显示, 养殖水体及健康的南美白对虾肠道中共检测到 6 个属的潜在的致病菌, 其中, 底泥、水和虾肠道中分别检测到 3、6 和 6 个致病菌属。在底泥中, 以假单胞菌属的占比最高(5.77%); 在水中, 以黄杆菌属(*Flavobacterium*)的占比最高(0.77%); 而在虾肠道中假单胞菌属的比例达 14.57%。在底泥中没有检测到气单胞菌属(*Aeromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)和立克次氏体(*Rickettsia*), 但这 3 种潜在致病菌均可在水体和

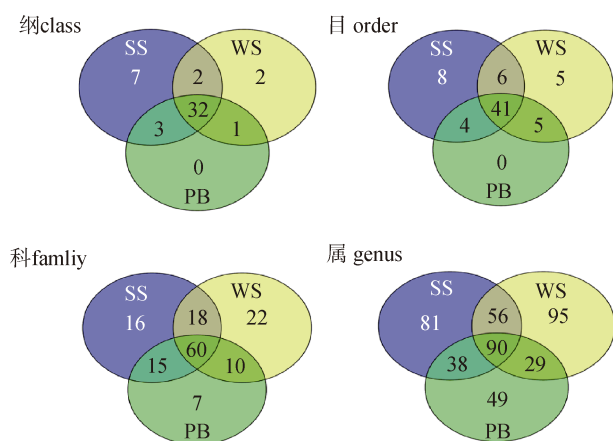


图 2 底泥(SS)、水体(WS)及南美白对虾肠道(PB)中细菌种群在纲、目、科和属水平上的 Venn 分析

Fig. 2 Veen analysis of bacteria at class, order, family and genus level in sediment (SS), water (WS) and *Penaeus vannamei* Boone intestine (PB)

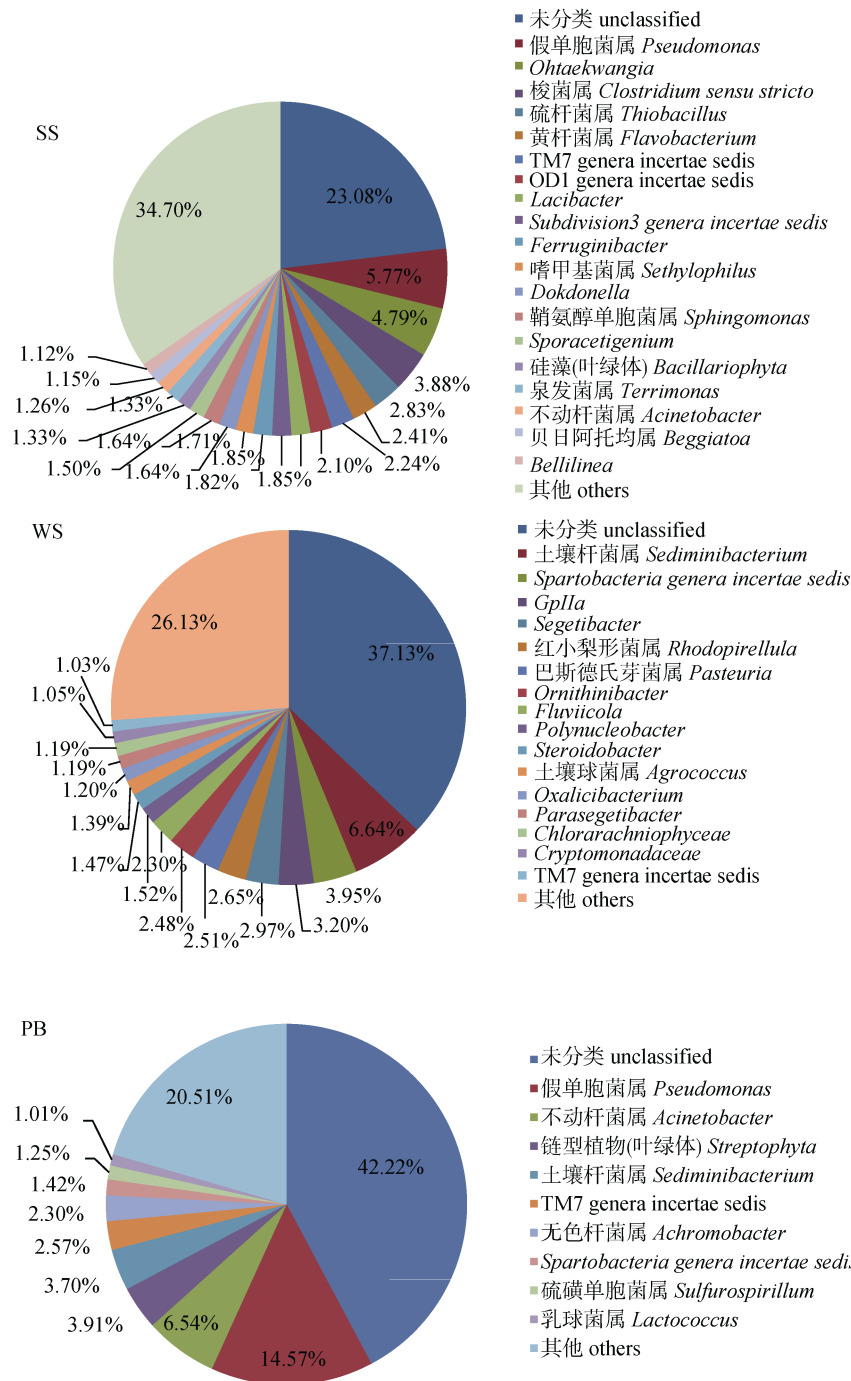


图 3 底泥(SS)、水体(WS)及南美白对虾肠道(PB)中的细菌种群优势属(>1%)的构成及分布比例

Fig. 3 Composition and distribution proportion of predominant genera in sediment(SS), water(WS) and *Penaeus vannamei* Boone intestine (PB)

肠道中检测到。在底泥中可检测到 8 个属的益生菌,在水和虾肠道中分别检测到 6 和 7 个属的益生菌,其中醋菌属(*Acetobacter*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)在水中没有检测到,红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)在虾肠道中没有检测到。在底泥、水和虾

肠道中占比最高的益生菌分别为链球菌属(*Streptococcus*)(0.73%)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*) (0.18%)和乳杆菌属(*Lactobacillus*) (1.01%)。比较底泥、水、虾肠道中益生菌和致病菌的比例可知,底泥、水和虾肠道中致病菌的比例均高于益生菌(表 4)。

表 4 南美白对虾肠道及养殖环境中益生菌、致病菌所占样品细菌总数的百分比
Tab. 4 percentages of probiotic and pathogenic bacteria number in *Penaeus vannamei* Boone intestine and their aquaculture environment samples

					%
细菌种类 bacterial kind		底泥 sediment	水 water	肠道 intestine	
致病菌 pathogenic bacteria	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	5.77	0.10	14.57	
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	2.41	0.77	0.76	
	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	0.28	0.01	0.06	
	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	—	0.02	0.18	
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	—	0.01	0.99	
	立克次体属 <i>Rickettsia</i>	—	0.27	0.02	
益生菌 probiotic	醋杆菌属 <i>Acetobacter</i>	0.07	—	0.04	
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.14	0.03	0.37	
	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	0.14	0.01	0.06	
	蛭弧菌属 <i>Bdellovibrio</i>	0.35	0.18	0.08	
	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	0.63	0.03	0.49	
	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0.21	—	1.01	
	红假单胞菌属 <i>Rhodopseudomonas</i>	0.03	0.03	—	
	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0.73	0.03	0.93	

注：“—”表示样品中无此菌属。
Note: “—” representing there is no this genera in sample.

2.5 养殖水体和南美白对虾肠道细菌种群的聚类分析

对养殖池塘底泥、水体及南美白对虾肠道细菌种群中丰富度位于前 20 的 OTU 进行系统聚类分析(图 4), 结果显示, 样品中丰富度位于前 20 的 OTU 可以分为二大群(I 和 II), 每个群可分为二个亚群(I-1、I-2 和 II-1、II-2), I-1 亚群可分为二个组(I-1-1 和 I-1-2)。在 I-1-1 组中, 鞘脂杆菌纲(Sphingobacteria)簇由 8 个 OTU 构成, 其中 4 个来源于水体, 3 个来源于底泥, 仅 1 个来源于对虾肠道; I-1-2 组主要由放线菌纲(Actinobacteria)细菌构成, 7 个 OTU 全部来源于水体; I-2 亚群主要由变形菌门(Proteobacteria)细菌构成, 在 β 变形菌纲(Betaproteobacteria)中, 有 2 个 OTU 来源于底泥, 来源于水体和虾肠道各 1 个 OTU; 18 个 OTU 属于 γ 变形杆菌纲(Gammaproteobacter), 其中 11 个 OTU 存在于对虾肠道样品中, 7 个 OTU 存在于底泥样品中, 而在水体前 20 个 OTU 中未发现 γ 变形杆菌纲; 在 II-1 亚群中, 构成梭状芽孢杆菌纲(Clostridia)簇的 3 个 OTU 全部来源于底泥; 在底

泥和虾肠道中细菌种群丰富度位于前 20 的 OTU 中不存在 TM7、放线菌纲(Actinobacteria)、浮霉菌纲(Planctomycetacia)和一种变形细菌 Proteobacteria, 黄杆菌纲(Flavobacteria)、 ϵ -变形菌纲(Epsilonproteobacteria)和厚壁菌门只存在于虾肠道细菌种群丰度位于前 20 的 OTU 中; 在底泥、水体及对虾肠道中前 20 种 OTU 中都存在一种无亲缘性的未分类的 OTU(Bacteria)。很明显, 底泥、水体及南美白对虾肠道细菌种群中丰富度位于前 20 的 OTU 的构成存在明显不同。

在丰度前 20 的 OTU 中, 虾肠道中检测到潜在致病菌有黄杆菌属(*Flavobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)和假单胞菌属, 益生菌有乳球菌属(*Lactococcus*); 泥样来源的丰度位于前 20 的 OTU 中的潜在致病菌只有假单胞菌属, 而水样中没有检测到假单胞菌属; 泥样和水样丰度前 20 的 OTU 中均没有益生菌。

3 讨论

微生物群落对环境变化敏感, 尹军霞等^[13]发现

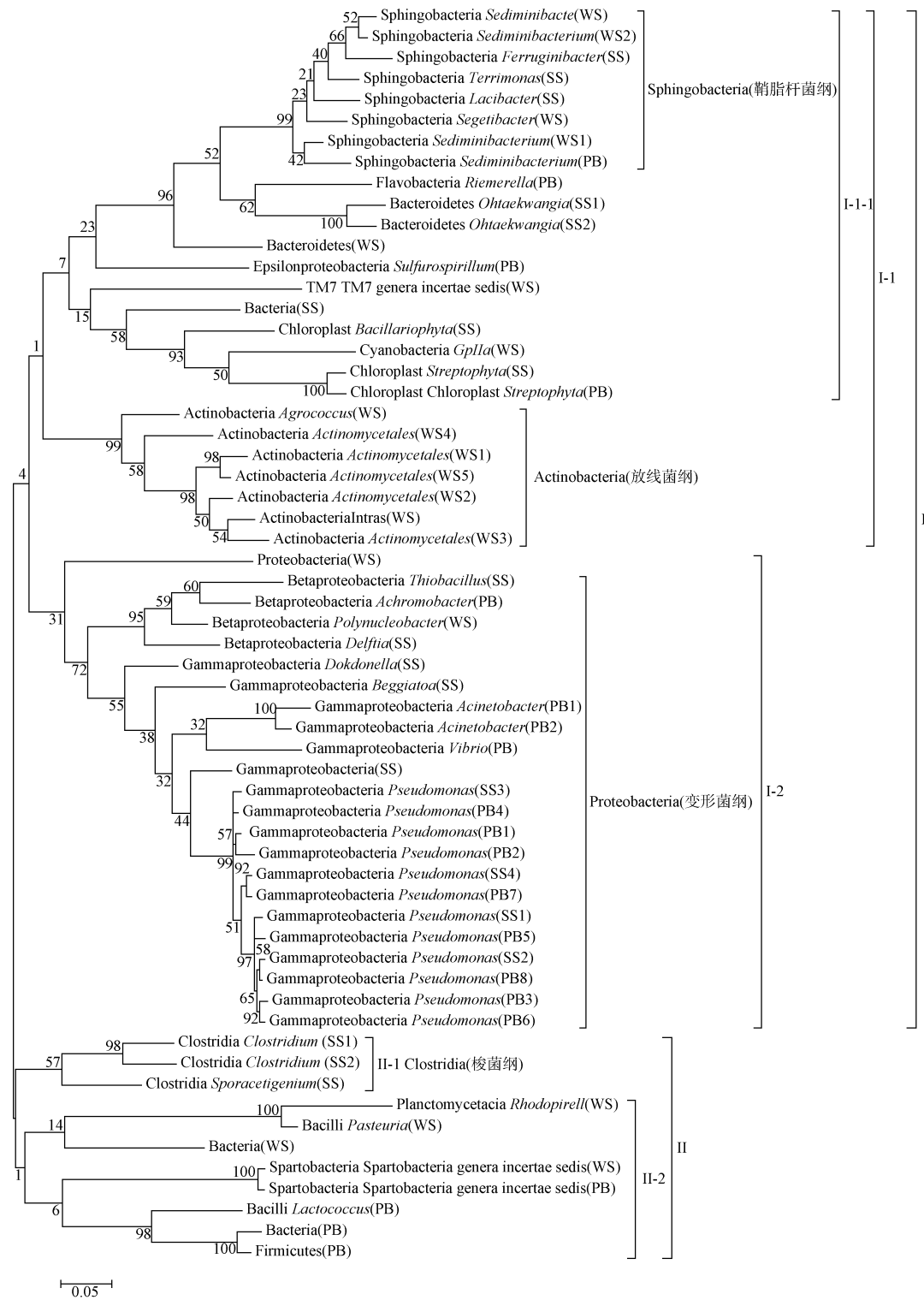


图 4 南美白对虾肠道及其养殖环境中的细菌种群优势 OTU(丰度位于前 20)的聚类分析

SS: 底泥; WS: 水体; PB: 南美白对虾肠道; 图中名称以其所属纲及属命名, 未分类到纲的以门命名, 未分类到属的以纲命名.

Fig. 4 Cluster analysis of top 20 OTUs (which relative abundance located top 20 in each sample) in *Penaeus vannamei* Boone intestine and their aquaculture environment

SS: sediment; WS: water; PB: *Penaeus vannamei* Boone intestine. Classes and genera of bacteria were indicated, phyla were indicated for which had not been classified to class, classes were indicated for which had not been classified to genera.

在南美白对虾肠道中厌氧菌、双歧杆菌随水温升高显著增加,而好氧菌总数、乳酸杆菌随水温升高变化不显著,肠道中厌氧菌总数比好氧菌多,且随着水温升高,厌氧菌的优势越明显;水质指标不仅影响养殖水体细菌种群的结构,也影响南美白对虾肠道细菌的组成及其健康程度。因此,探讨南美白对虾肠道细菌种群结构必需结合养殖环境综合分析。本研究检测结果显示,南美白对虾养殖池塘水质指标处在正常范围内,因此,本研究的结果是在正常水质情况下分析养殖池塘底泥及水体对南美白对虾肠道中的细菌种群的影响。

国内外学者曾通过分离纯化培养法或 16S rRNA 基因克隆文库法研究了对虾肠道细菌种群结构。王祥红等^[14]通过纯培养法从野生健康中国对虾(*Penaeus chinensis*)成虾肠道中分离出 47 株菌,分别属于 8 个属。宛立等^[6]采用纯培养法从健康养殖的南美白对虾肠道内检测到 111 株细菌,分别属于 13 个属(科)。李可等^[7]通过 16S rRNA 基因克隆文库方法对实验室养殖条件下的南美白对虾肠道细菌进行了多样性研究,得到 2 个不同的细菌类群:变形细菌(*Proteobacteria*)和厚壁细菌(*Firmicutes*)。本研究通过高通量测序技术,从南美白对虾肠道中共检测到 206 个细菌属,所检测到的细菌属数远远高于纯培养法和 16S rRNA 基因克隆文库法检测到的细菌,说明高通量测序在研究肠道细菌种群方面具有明显的优势,采用该技术获得的结果能更加全面、真实反映南美白对虾肠道细菌种群。

Tang 等^[15]曾用 454-焦磷酸测序技术分析了对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道细菌种群,发现放线菌门(*Actinobacteria*)、未分类细菌门、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是优势菌门,分别占比为 53.5%、22.4%、18.8%和 4.32%。本研究结果显示,变形菌门(34.80%)、一种未分类的细菌门(25.74%)和厚壁菌门(18.89%)是南美白对虾肠道细菌的优势菌门,表明 2 种对虾肠道细菌有相似之处,但 2 种对虾肠道细菌种群结构仍存在明显差异,推测除与养殖环境有关以外,与不同对虾肠道的生理状态不同有

密切关系。在凡纳滨对虾和南美白对虾肠道细菌中,一种未分类的细菌门的丰度达到 20%以上,在属水平上,一种未分类的细菌属占南美白对虾肠道细菌菌群的 42.22%,表明对虾肠道细菌种群的组成和结构仍有许多不明之处,值得进一步探讨。

以往的研究结果显示,健康的凡纳滨对虾肠道中检测到气单胞菌属、分支杆菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、沙雷氏菌属和弧菌属等潜在致病性细菌^[16],弧菌在水生动物养殖环境中普遍存在,是小虾幼苗期的主要致病菌,能引起疾病爆发导致死亡^[16-20]。在本研究中,从健康的南美白对虾肠道中检测到 6 个属的潜在的病菌,包括假单胞菌属、黄杆菌属、气单胞菌属、弧菌属和立克氏体等,2 种对虾肠道中检测到的潜在致病菌的种类有一定的相似性,暗示凡纳滨对虾和南美白对虾发生细菌性疾病的种类相似。水生动物中的细菌性病原往往属于条件致病菌,值得注意的是,在南美白对虾中的肠道中假单胞菌属的丰度达 14.57%,因此养殖生产中必须重视环境条件诱发起的假单胞菌感染性疾病。

益生菌是动物健康生长必不可少的菌群,具有维持肠道细菌菌群的平衡、产生消化酶有助于营养物质的吸收、产生重要的营养物质促进生长、抵抗致病菌和病毒的感染等作用。本研究在南美白对虾肠道中检测到 6 个细菌属的益生菌,约占肠道细菌的 2.98%,其中乳球菌属(1.01%)和链球菌属(0.93%)、乳酸杆菌属(0.49%)、芽孢杆菌属(0.37%)是优势益生菌。乳球菌属的部分细菌可合成一种具有抗菌作用的乳球菌肽,而链球菌属中的嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)有抑制肠道致病菌、调节作为炎症指标的几种免疫因子的作用^[21];乳酸杆菌对低 pH 值具有高度的耐受性,可维持低的 pH 环境,防止细菌的感染,并具有抗炎等潜在的治疗作用。芽孢杆菌能产生多种消化酶^[22],帮助动物对营养物质的消化吸收。因此,可以认为这些益生菌对维持南美白对虾肠道正常细菌平衡、抑制致病菌的繁殖、营养物质的消化吸收有重要作用。

养殖环境微生物多样性分析、环境微生物与宿主的互作及水生动物肠道菌群的研究可为理解水体中的微生物与水生动物间的互作、动物肠道菌群结构与健康状况提供大量有益信息,同时为通过调节水质、改善水体微生物的种群结构,减少水生动物疾病的发生提供新的线索^[16, 23-25]。有研究发现池塘养殖的斑节对虾的幼虾(*Penaeus monodon*)的死亡率与养殖环境中弧菌(*Luminescent vibrios*)关系密切^[16-17]。本研究结果显示, 17 个细菌门、32 个纲、41 个目、60 个科和 90 个属在底泥、水和南美对虾肠道中均能检测到,表明底泥、水和南美对虾肠道中的细菌存在密切的相互作用。样品菌群在门、纲、目、科、属水平上的分布可以看出底泥和水体的共有细菌最多,其次是底泥和南美白对虾肠道的共有细菌,水体和南美白对虾肠道的共有细菌最少,在一定程度上可以推测底泥中细菌种群对南美白对虾肠道细菌种群的影响稍大。在养殖池塘底泥中可检测到益生菌红假单胞菌,但在南美白对虾肠道中检测不到,表明红假单胞菌在南美白对虾肠道中难以定植,暗示在南美白对虾养殖中使用红假单胞菌制剂的效果可能不太理想;比较底泥和南美白对虾肠道中检测到的益生菌种类及其丰度,可以推测,在南美白对虾养殖中,使用含有乳球菌、链球菌、乳酸杆菌和芽孢杆菌的益生菌制剂可能具有更好的效果。

南美白对虾肠道及其养殖环境中细菌种群优势 OTU 聚类分析结果显示,底泥、水体及南美白对虾肠道细菌种群中丰富度位于前 20 的 OTU 在聚类树的位置存在明显不同,南美白对虾肠道和底泥样品中 γ 变形杆菌纲占据较大比例,而水体中前 20 的 OTU 中无 γ 变形杆菌纲细菌,底泥中包括菌属 *Dokdonella*、*Beggiatoa* 和假单胞菌属,南美白对虾肠道中包括菌属不动杆菌属、弧菌属和假单胞菌属;水体样品中放线菌纲所占比例较大,主要包括菌属 *Agrococcus*、*Actinomycetales* 和 *Intras*,而底泥和肠道样品中丰度前 20 的 OTU 中没有发现线菌纲;属于鞘脂杆菌属(*Sphingobacteria*)和 β 变形菌属(*Betaproteobacteria*)的 OTU 同时存在于 3

种样品中。由此推测,南美白对虾肠道菌群同时受底泥和水体菌群影响,但来自底泥的影响大于水体,肠道菌群中的潜在致病菌假单胞菌属可能主要受到底泥的影响。

参考文献:

- [1] Devaraja T N, Yusoff F M, Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products[J]. Aquaculture, 2002, 206(3-4): 245-256.
- [2] Verscuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 655-661.
- [3] Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract of prawn, *Penaeus japonicus* Bate[J]. Aquaculture, 1980, 19(3): 229-234.
- [4] Harris J M. The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis[J]. Microb Ecol, 1993, 25(3): 195-231.
- [5] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1-2): 147-165.
- [6] Wan L, Wang J Q, Gao F, et al. Bacterial flora in intestines of white leg shrimp (*Penaeus vannamei* Booen)[J]. Fisheries Science, 2006, 25(1): 13-15. [宛立, 王吉桥, 高峰, 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析[J]. 水产科学, 2006, 25(1): 13-15.]
- [7] Li K, Zheng T L, Tian Y, et al. Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 649-653. [李可, 郑天凌, 田蕴, 等. 南美白对虾肠道微生物群落的分子分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 649-653.]
- [8] Liu H D, Wang L, Wang B J, et al. Analysis on the diversity of microorganism in intestine of *Penaeus vannamei*-cultured by PCR-DGGE[J]. Feed Industry, 2008, 29(20): 55-58. [刘淮德, 王雷, 王宝杰, 等. 应用 PCR-DGGE 分析南美白对虾肠道微生物多样性[J]. 饲料工业, 2008, 29(20): 55-58.]
- [9] Dennis P G, Guo K, Imelfort M, et al. Spatial uniformity of microbial diversity in a continuous bioelectrochemical system[J]. Bioresour Technol, 2013, 129: 599-605.
- [10] Li S, Chou H H. Lucy2: an interactive DNA sequence quality trimming and vector removal tool[J]. Bioinformatics, 2004, 20(16): 2865-2866.
- [11] Cole J R, Wang Q, Cardenas E, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. Nucl Acid Res, 2009, 37: D141-145.
- [12] Motegi C N T, Miki T, Weinbauer M G, et al. Interactive

- effects of viral and bacterial production on marine bacterial diversity[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e76800.
- [13] Yin J X, Shen W Y, Li P. Study on the influence of water temperature on the intestinal microflora of *Penaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2004, 28(5): 33–36. [尹军霞, 沈文英, 郦萍. 水温对南美白对虾肠道菌群影响的研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 33–36.]
- [14] Wang X H, Li H R, Zhang X H, et al. Flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*)[J]. Journal of Qingdao Ocean University, 2000, 30(3): 493–498. [王祥红, 李会荣, 张晓华, 等. 中国对虾成虾肠道微生物区系[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 493–498.]
- [15] Tang Y Y, Tao P Y. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(8): 13663–13680.
- [16] Lavilla-Pitogo C R, Leaño E M, Paner M G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment[J]. Aquaculture, 1998, 164(1–4): 337–349.
- [17] Sung H H, Hsu S F, Chen C K, et al. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation[J]. Aquaculture, 2001, 192(2–4): 101–110.
- [18] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(3): 403–431.
- [19] Bourne D G, Young N, Webster N, et al. Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*[J]. Aquaculture, 2004, 242(1–4): 31–51.
- [20] Zhou J F, Fang W H, Yang X L, et al. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e29961.
- [21] Bai H. Health Food Ingredient Detection[M]. Beijing: China Traditional Medicine Press, 2011: 60. [白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 60.]
- [22] Moriarty D J. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds[J]. Aquaculture, 1998, 164(1–4): 351–358.
- [23] Sun Z, Li G P, Wang C W, et al. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6966.
- [24] Boutin S, Bernatchez L, Audet C, et al. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota[J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e84772.
- [25] Wu S G, Wang G T, Esther R, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e30440.

Bacterial diversity in the *Penaeus vannamei* Boone intestine and aquaculture environment

SUN Zhenli¹, XUAN Yinming², ZHANG Hao¹, JIANG Ming², PAN Yunsheng², ZHANG Yiming², GONG Yeping², LU Xiaoping², YU Deshan², XUE Renyu¹, HU Xiaolong¹, CAO Guangli¹, GONG Chengliang¹

1. School of Biology & Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. Aquaculture Technical Extension Station of Kunshan City, Suzhou 215300, China

Abstract: To investigate the bacterial species composition and distribution in the intestine of *Penaeus vannamei* Boone and its aquacultural environment, we used Illumina MiSeq high-throughput pyrosequencing to analyze the composition of the bacterial communities in the gut of *P. vannamei* Boone and its aquacultural sediments and water, based on the 16S rRNA sequence. We detected 206, 265, and 270 genera in the gut of *P. vannamei* Boone, the aquaculture sediment, and the water, respectively. Ninety genera occurred in all three samples, 146 genera in the sediment and water, 128 in the sediment and *P. vannamei* Boone intestine, and 119 in the water and *P. vannamei* intestine. This indicates the close interaction between the bacteria in the shrimp intestine and their aquacultural environment. Twenty, seventeen, and ten dominant genera with a relative abundance in the total sequences of > 1% occurred in the sediment, water, and *P. vannamei* intestine, respectively. Unclassified genera were the most abundant in all the samples, accounting for 23.08%, 37.13%, and 42.22% of the total sequences from the sediment, water, and *P. vannamei*, respectively. However, *Pseudomonas* (5.77%), *Ohtaekwangia* (4.79%), and *Clostridium* (3.88%) were the dominant genera in the sediment; *Sediminibacterium* (6.64%), *Spartobacteria genera incertae sedis* (3.95%), and *GPIIa* (3.20%) were the dominant genera in water; and the predominant genera in the *Penaeus vannamei* Boone intestine were *Pseudomonas* (14.57%) and *Acinetobacter* (6.54%). Three, three, and six potentially pathogenic bacterial genera were also observed in the sediment, water, and *Penaeus vannamei* Boone intestine, respectively, and the most abundant were *Pseudomonas* (5.77%), *Flavobacterium* (0.77%), and *Pseudomonas* (14.57%), respectively. Six, eight, and seven probiotic genera were also found in the sediment, water, and *Penaeus vannamei* Boone intestine, respectively, and among these genera, five were shared by all three samples. A cluster analysis showed that the 20 most abundant operational taxonomic units in each sample (sediment, water, and *Penaeus vannamei* Boone intestine) differed significantly. These results provide insight into the interactions between the microbiota in the intestine of *P. vannamei* Boone and those in its aquacultural environment, and provide new data for the development of probiotics.

Key words: *Penaeus vannamei* Boone; aquaculture water; sediment; intestine; bacterial community

Corresponding author: GONG Chengliang. E-mail: gongcl@suda.edu.cn