

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15364

凡纳滨对虾不同养殖密度高位池水体细菌群落动态

陈琛^{1,2}, 闫茂仓^{1,2}, 张翔^{1,2}, 於俊琦^{1,2}, 柴雪良^{1,2}, 曾国权^{1,2}

1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005;
2. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005

摘要: 通过对养殖水体环境基因组 DNA 中细菌 16S rRNA 基因 V4-V5 区的高通量测序和生物信息学分析, 研究了两种养殖密度的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)高位池水体中细菌群落在养殖过程中的动态。结果显示, 养殖过程中各菌群相对丰度变化明显, 细菌多样性随时间逐渐提高, 优势菌群为变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)。随着养殖时间增长, 蓝藻丰度所占比例逐渐减少, 而变形菌、拟杆菌和浮霉菌丰度逐渐增大, 同时养殖前期高密度池浮霉菌丰度显著高于低密度池($P < 0.01$), 而其他菌群无显著差异。结果表明, 养殖期前 50 d 不同养殖密度水体细菌群落差异较大, 而后 30 d 内细菌群落的时间异质性大于空间异质性, 这意味着高位池水体菌相被划分为两类, 到养殖后期菌相快速转变, 养殖密度所带来的影响被减弱。

关键词: 细菌群落; 凡纳滨对虾; 养殖密度; 高位池; 高通量测序; 16S rRNA 基因

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2016)04-0985-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)目前是全球范围内主要虾养殖种类^[1], 在对虾养殖过程中, 养殖密度是影响对虾生长和免疫力的主要因素之一。李玉全等^[2]发现密度胁迫是造成对虾生长和免疫力差异的主因, 而环境理化的作用居次。对虾溶菌酶活性也会随养殖密度增大而降低^[3]。虽然高养殖密度会提高对虾单位产量, 但有研究报道高密度养殖会使对虾幼体存活率降低, 增重减缓, 个体间增重差异明显, 从而导致养殖规格不齐^[4-5]。同时, 有研究发现罗氏沼虾活动频率和攻击频次随养殖密度增大而明显提高, 从而使耗氧率和排氨率升高, 导致生长能减少, 代谢和排泄消耗增大^[6]。

此外, 高密度养殖过程中饵料投放量增大, 使得养殖水体中残饵和排泄物增多, 从而导致水

质恶化加快。例如, 有研究发现养殖水体 pH 值随养殖密度与时间增加而降低, 氨氮量也随之增大^[7], 即使在养殖同一时期, 高密度养殖水体中的氨氮和亚硝氮浓度也比低密度养殖的高^[8]。这表明高养殖密度在影响对虾生长性能和免疫力的同时, 也明显改变了养殖水体的水质, 而水体环境的改变会影响养殖水体微生物群落结构, 从而影响微生物参与的有机质分解和营养盐转化的功能^[9-10]。先前的对虾养殖环境生物多样性研究多基于 DNA 指纹图谱(如 DGGE)和 16S rRNA 基因克隆文库技术^[11-12], 但受技术本身所限, 难以全面深入地解析细菌群落组成。随着高通量测序技术的发展, 基于 16S rRNA 基因片段的高通量测序逐渐成为微生物群落组成研究的主要手段之一, 其最大的优势在于能够更加全面地解析微生物群落

收稿日期: 2015-09-18; 修订日期: 2015-11-13.

基金项目: 浙江省重大科技专项(2012C12017-3); 国家虾产业技术体系温州综合试验站项目(CARS-47); 浙江省科技计划项目(2012F20029, 2014F30025, 2015F50008); 温州市科技计划项目(S2015002)资助。

作者简介: 陈琛(1980-), 男, 学士, 工程师, 主要研究方向为海水养殖. E-mail: 10006986@qq.com

通信作者: 张翔, 助理研究员. E-mail: jhon618@sohu.com

中的细菌种类和数量^[13]。

为了揭示不同养殖密度下凡纳滨对虾高位池养殖过程中水体微生物群落结构变化,本研究以循环水养殖系统中不同养殖密度高位池为研究对象,通过对养殖水体环境基因组 DNA 中 16S rRNA 基因 V4-V5 区的高通量测序和生物信息学分析,揭示不同养殖密度水体中浮游细菌群落的组成和动态。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在浙江温州龙湾区永兴凡纳滨对虾养殖基地的循环水养殖系统中进行养殖实验,高位池为全封闭式,各池有独立水泥墙体,顶部为透明塑料布覆盖,各池面积均为 750 m²。所有高位池均使用循环水养殖系统砂滤水作为进水,养殖期间全天进行底增氧曝气,同时对虾饲料投喂和日常管理方式均一致。选择相邻高位池设置两个养殖密度,分别为高密度池(high-density pond, H)投放虾苗 15 万尾(200 尾/m²),低密度池(low-density pond, L)投放虾苗 10 万尾(133 尾/m²)。2013 年 5 月 10 日起,每隔 15 d 采集各池水样一次,至凡纳滨对虾生长至商品规格(约 80 尾/kg)共采集 5 次,分别标记样品为高密度池 H1-H5,低密度池样品 L1-L5。每次采样后用 0.22 μm 孔径无菌滤膜(millipore)抽滤 100 mL 水样,每个样品抽滤 2 片滤膜,然后将滤膜封装于自封袋中,冻存于-80℃超低温冰箱,保存至样品全部采集完毕。

1.2 DNA 提取和 MiSeq 高通量测序

样品采集完毕后,将滤膜从超低温冰箱取出,用灭菌手术剪剪碎,放入 50 mL 无菌离心管,然后按照环境基因组提取试剂盒 Water DNA kit (Omega)技术手册中提供的标准流程(吸附柱法)提取滤膜中环境基因组 DNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量检测。

对环境基因组 DNA 中细菌 16S rRNA 基因 V4-V5 区进行 PCR 扩增。PCR 在 ABI GeneAmp 9700 型热循环仪中进行,引物为 515F(5'-GTG CCA GCM GCC GCG G-3')和 907R(5'-CCG TCA

ATT CMT TTR AGT TT-3'),每个样品 3 个重复。PCR 反应采用 TransGen 20 μL 体系,其组分为:5×FastPfu buffer, 4 μL; 2.5 mmol/L dNTPs, 2 μL; 5 μmol/L 正反向引物各 0.8 μL; FastPfu DNA 聚合酶, 0.4 μL; 模板 DNA 10 ng; 加灭菌 ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应参数如下:95℃预变性 3 min,然后 95℃变性 30 s; 55℃退火 30 s; 72℃延伸 30 s,共计 28 个循环,最后 72℃延伸 10 min。将同一样品的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN)切胶回收 PCR 产物,2%琼脂糖电泳进行检测。PCR 产物利用 Illumina Miseq PE250 平台进行高通量测序,每个样品至少测 10000 条序列以上。

1.3 生物信息学与统计分析

根据 Barcode 序列将下机数据拆分为不同样品数据,并截去 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列。使用 FLASH Version 1.2.7 对各样品 reads 进行拼接并进行处理得到高质量 Tags 数据,并利用 Qiime Version 1.7.0 检测并去除嵌合体序列。之后将 Tags 序列与数据库(gold database)进行比对(UCHIME algorithm)。利用 Uparse Version 7.0.1001 对所有样品重采样的有效序列进行聚类,默认将具有 97%一致性的序列聚类成为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。将 Uparse 构建 OTU 时选取的代表性序列与 Silva 119 库比对,得到每个 OTU 的分类学信息,每个 OTU 在数据分析中被视为一种细菌。

利用 R 语言(R version 3.1.3)中的 vegan 程序包计算不同样品间细菌群落的 Bray-Curtis 距离矩阵,然后通过生物统计软件 XLSTAT 2014 进行基于 Bray-Curtis 距离矩阵的多维尺度分析(multi dimensional scaling, MDS)和聚类分析并作图。细菌类群多样性采用 Shannon-Wiener 指数(H')表示,利用 R 语言(R version 3.1.3)vegan 程序包计算各个样品的 H' 值。计算各个样品中单一细菌 OTU 在 OTU 总数中所占百分比,选取比例超过 1%的细菌中前 10%作为优势菌,将各细菌百分比数据进行以 10 为底的 log 转换,利用 R 语言(R version 3.1.3)制作热图。

2 结果与分析

2.1 高通量测序质量分析

对各样品中 Miseq 高通量测序结果进行统计分析, 结果显示所有样品的有效序列数(Reads)全部达到 12000 条以上, 测序结果能较好地反映不同样品浮游细菌群落组成。经过数据库比对和序列聚类分析, 结果显示高位池不同养殖阶段有效 OTU 总数为 1264 个, 各个时期的 OTU 数量

见表 1, 其中高密度池 OTU 平均值(549.4)高于低密度池(431.8)。

通过随机抽取的序列数及其所含的 OTU 数量制作稀释曲线, 结果显示(图 1), 所有样品的稀释曲线均随有效序列数量的增加而趋于平缓, 这表明测序获得的有效 OTU 数量覆盖了水体样品中绝大部分细菌物种数, 能较好地反映各个养殖阶段水体中浮游细菌的物种多样性。

表 1 各凡纳滨对虾样品高通量测序结果分析
Tab. 1 Analysis of the high-through sequencing results

样品 sample	有效序列 reads	有效 OTU OTUs	样品 sample	有效序列 reads	有效 OTU OTUs
H1	23798	466	L1	20686	380
H2	12030	381	L2	17927	383
H3	13181	534	L3	27502	492
H4	23523	589	L4	24421	469
H5	22152	777	L5	12606	435

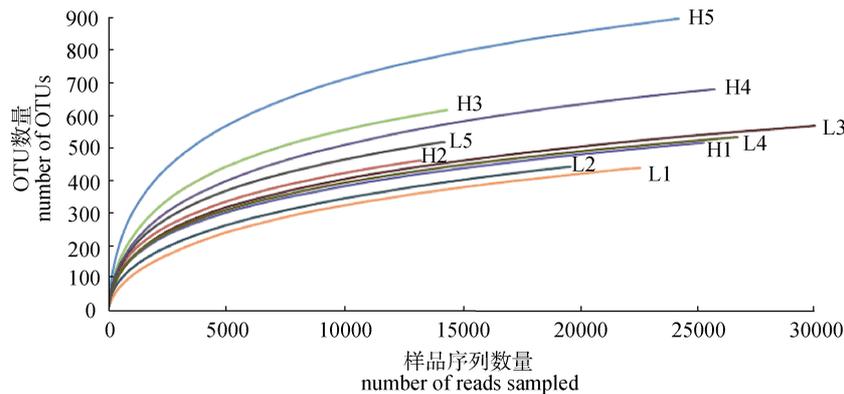


图 1 各凡纳滨对虾样品高通量测序结果的稀释曲线
高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5。

Fig. 1 Rarefaction curves of high-throughput sequencing results

H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

2.2 不同密度养殖池细菌群落组成分析

如图 2 所示, 各样品间细菌种群相对丰度变化明显, 不同养殖密度高位池中优势细菌种群分别属于变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)。高密度池养殖前期主要优势细菌 OTU 分别属于蓝藻、红杆菌科、海洋螺菌目 OM182 进化枝、鞘脂杆菌目 NS11-12 海洋类群、微杆菌科 SV1-8、Phycisph-

aeraceae CL500-3、腐螺旋菌科、Marinicella, 养殖后期则分别属于红杆菌科、黄杆菌科、弧菌科、Marinicella、小梨形菌属、蓝藻。低密度池养殖前期优势细菌 OTU 分别属于蓝藻、红杆菌科、黄杆菌科、交替单胞菌科、酸微菌科、火色杆菌科、立克次氏体、腐螺旋菌科, 养殖后期则分别属于红杆菌科、黄杆菌科、拟杆菌、微杆菌属、冷菌属、冷单胞菌科、蓝藻 Family I。结果显示, 在养殖前期, 几种蓝藻 OTU 占优势(30%~60%), 随着

养殖进行其丰度逐渐降低,到养殖后期红杆菌科、黄杆菌科和腐螺旋菌科 OTU 开始占优势,但大部分菌群丰度在 10%以下,仅红杆菌科鲁杰氏菌属的一种细菌 OTU 在 L4 样品中占 17.5%。

如表 2 所示,不同样品中 5 个优势细菌类群共占细菌 OTU 总数的 98%以上,随着养殖时间增长,蓝藻开始大量减少,而变形菌、拟杆菌和浮霉菌逐渐增多,养殖前期高密度池(H1-H3)浮霉菌丰度显著高于低密度池(L1-L3)($P=0.0053$)。

选取所有样品中前 10%优势菌 OTU 构建热图(图 3)。结果显示,所有样品中优势菌群前 10%

细菌共 48 种,占细菌总数 3.8%,在各个样品所占比例分别为高密度池 56.51%(H1), 68.56%(H2), 59.81%(H3), 59.49%(H4), 43.01%(H5)和低密度池 87.29%(L1), 73.86%(L2), 73.94%(L3), 67.17%(L4), 56.47%(L5)。优势菌群 OTU 只占细菌 OTU 总数极少部分(3.8%),但其总丰度平均约占细菌总丰度一半以上,其中低密度池最高达 87.29%。如图 3 所示,优势菌群的聚类分析结果与总细菌群落的聚类分析(图 4b)结果一致,均显示养殖前期不同养殖密度水体细菌群落有差异,而养殖后期则同一时期不同养殖密度高位池细菌群落趋近于相似。

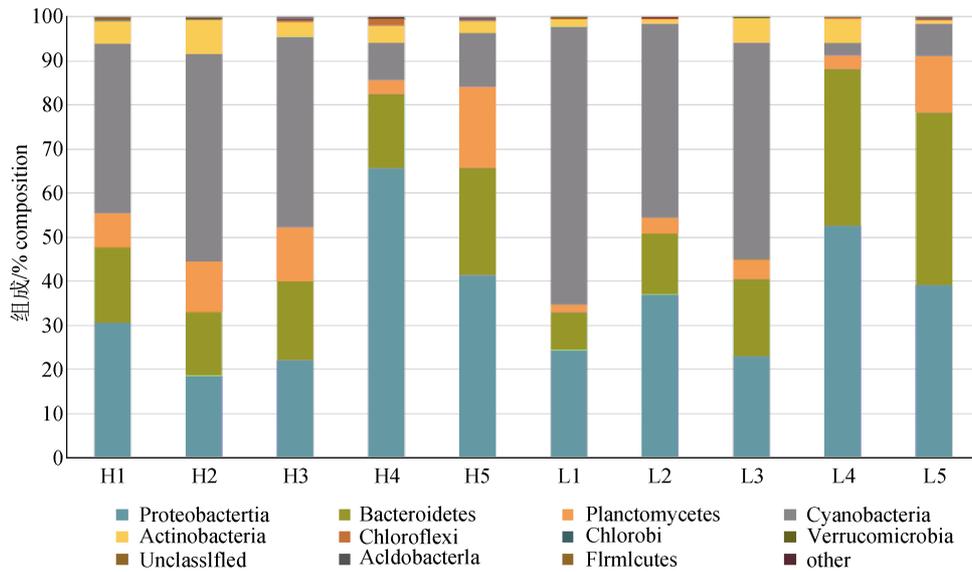


图 2 各时期高位池中浮游细菌群落结构组成

高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5。

Fig. 2 Bacterioplankton community composition of different samples in intensive pond

H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

表 2 凡纳滨对虾高位池优势细菌类群在不同养殖时期细菌 OTU 所占比例

Tab. 2 OTU ratio of dominant bacterial subgroups in different stocking stage of intensive pond

细菌门类 Taxonomy	H1	H2	H3	H4	H5	L1	L2	L3	L4	L5	%
变形菌门 Proteobacteria	30.64	18.55	22.13	65.68	41.40	24.36	37.03	22.91	52.59	39.20	
拟杆菌门 Bacteroidetes	17.13	14.54	17.87	16.88	24.48	8.64	13.86	17.65	35.64	39.16	
浮霉菌门 Planctomycetes	7.73	11.46	12.23	3.15	18.32	1.76	3.62	4.42	3.03	12.80	
蓝藻门 Cyanobacteria	38.44	47.06	43.31	8.48	12.18	63.13	44.03	49.23	2.84	7.39	
放线菌门 Actinobacteria	5.12	7.79	3.39	3.85	2.70	1.62	0.95	5.49	5.55	0.69	
总计 total	99.05	99.39	98.93	98.03	99.09	99.51	99.49	99.71	99.66	99.23	

注: 高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5。

Note: H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

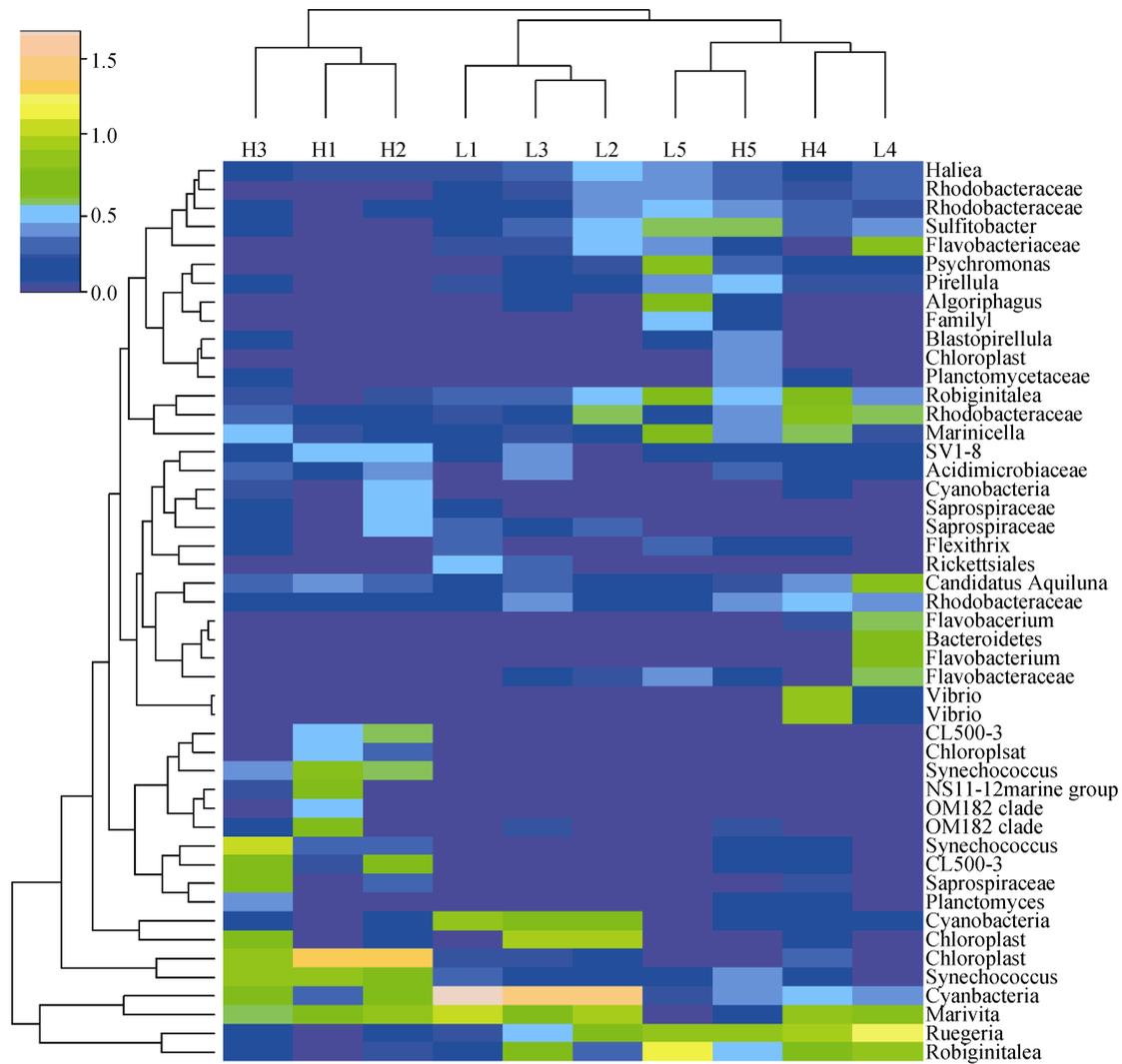


图 3 各养殖阶段优势细菌 OTU 热图

高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5.

Fig. 3 Heatmap of the dominant bacteria OTUs in different samples of intensive ponds

H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

各个养殖时期样品的细菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数(图 5)显示, 高密度池细菌多样性指数平均值(4.36)高于低密度池(3.51), 并且随着养殖进行到后期, 两个高位池细菌多样性均逐渐提高。由多维尺度分析(图 4a)和聚类分析(图 4b)结果可知, 所有样品大致被划分为三类, 分别是高密度池 H1-H3, 低密度池 L1-L3 和其他后期样品。结果显示养殖前期不同养殖密度水体细菌群落有较大差异, 而养殖后期同一时段不同养殖密度高位池细菌群落趋于相似, 这表明高位池细菌相明显存在两个阶段, 分别是养殖前期(0~50 d)和养殖后期(50~80 d)。

3 讨论

凡纳滨对虾的生长性能、存活率和养殖密度是对虾养殖业首要关心的问题。有案例报道, 凡纳滨对虾的养殖密度范围较为宽泛(150~600 尾/m³), 并且在高密度养殖下也能保持较高的生长和存活率^[14-15]。之前有研究证明, 100 尾/m³ 以下的养殖密度对凡纳滨对虾生长性能无影响^[16-17]。同时, 过高的养殖密度会影响对虾抗病力, 表现在杀菌能力和细胞吞噬活性下降, 免疫相关基因表达下调^[18]。因此, 本文中选择了常规养殖密度(133 尾/m²)

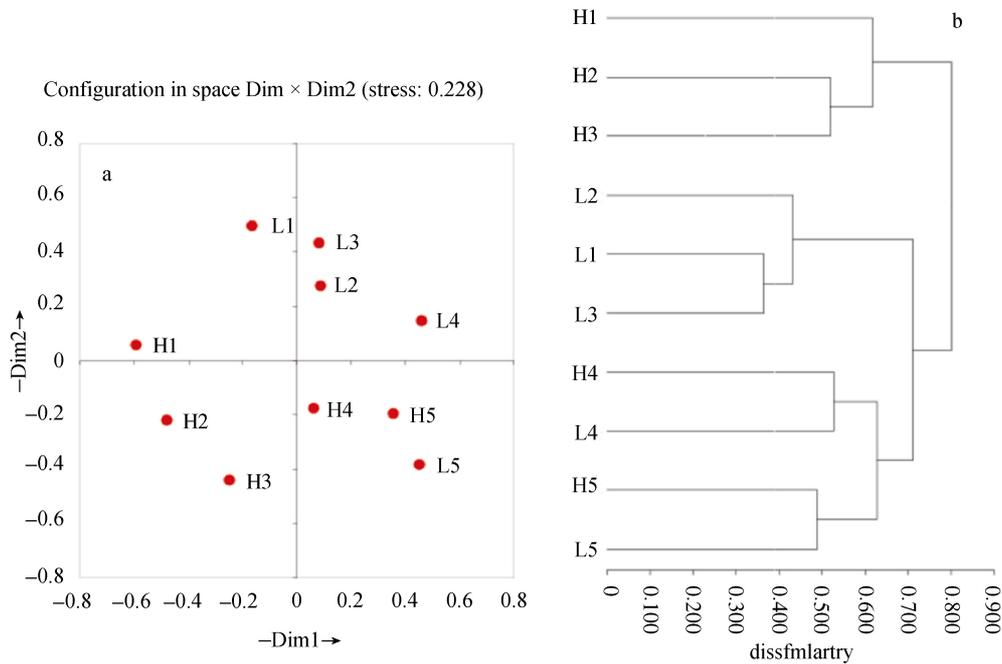


图 4 高位池浮游细菌群落多维尺度分析(a)和聚类分析图(b)
高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5.

Fig. 4 MDS and hierarchical cluster analysis plots of bacterioplankton in different samples of intensive ponds
H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

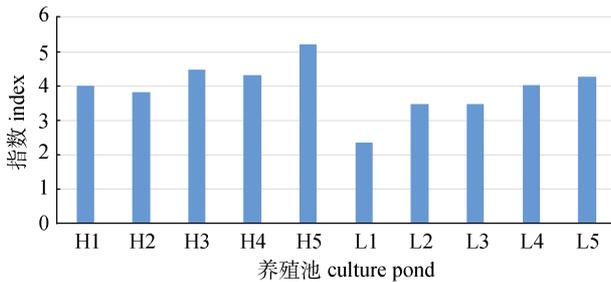


图 5 各养殖时期细菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数
高密度池样品为 H1-H5, 低密度池样品为 L1-L5.

Fig. 5 Shannon-Wiener diversity indices of bacterial community in samples of intensive ponds
H1 to H5 indicate the samples collected from high-density pond. L1 to L5 indicate the samples collected from low-density pond.

和相对高密度(200 尾/m²)高位池进行研究, 以期减小对虾染病风险, 保证养殖过程顺利完成。

有研究报道, 在土塘养殖长毛对虾结束时, 蓝细菌、红杆菌和黄杆菌在养殖水体中是占优势的微生物种群^[19]。这与本文中高位池养殖初期的优势细菌种群组成类似。有研究报道养殖中后期对虾高位池水体富营养化严重, 绿藻和蓝藻替代硅藻成为优势种群^[20], 但本研究高位池养殖后期

蓝藻大量减少, 这可能是由于本文高位池养殖后期营养盐浓度较低所致。黄杆菌被认为是水生动物潜在的条件致病菌, 如果大量存在会增加对虾染病风险^[21]。虽然本研究的养殖过程中黄杆菌作为优势种群长期存在, 但养殖期间对虾生长和健康情况良好, 这可能暗示黄杆菌是一类条件致病细菌。养殖前期高密度池(H1-H3)浮霉菌丰度显著高于低密度池(L1-L3)($P < 0.01$), 其他菌群则无显著差异, 其中 Phycisphaeraceae CL500-3 是高位池养殖前期浮霉菌门中的优势细菌。有研究发现 Phycisphaeraceae CL500-3 参与反硝化作用^[22], 在高污染的膜上丰度相对较大^[23], 这表明由高密度养殖带来的大量残饵和排泄物促使该类细菌大量繁殖, 从而使其丰度显著高于低密度池。

浙江沿海地区凡纳滨对虾高位池养殖周期通常为 100 d 左右, 其中前 20 d 为温室育苗期, 后 80 d 为高位池养殖期。本研究中多维尺度分析(图 4a)和聚类分析(图 4b)结果显示, 养殖周期前 50 d 内不同养殖密度高位池微生物群落有明显差异, 被划分到两个不同簇, 而后 30 d 内的同一时期两

个高位池微生物群落趋于相似, 后期不同时间段同池样品群落差异甚至超过养殖密度不同所带来的影响。在珠三角地区, 有研究发现典型对虾养殖水体中细菌群落结构时间差异造成的影响比空间差异更大^[24], 这与本文养殖后期水体微生物群落变化一致。这表明, 高位池水体菌相快速转变期间(养殖到 50 d 之后)所带来环境应激有可能引发对虾疾病, 可在该阶段采取相应措施以降低环境应激。在养殖前期, 优势菌群表现出单一物种高丰度的特点, 然而, 随养殖进行到后期, 优势菌总丰度表现出下降趋势, 这表明细菌群落均匀度和多样性在提高, 养殖后期更多细菌参与了高位池有机物质分解和营养盐转化。之前的研究也发现, 作为典型的生物硝化系统, 养虾池塘水环境中氮素循环关键过程的菌群多样性丰富^[25]。

综上所述, 不同养殖密度高位池水体中优势菌群分别属于变形菌门、蓝藻门、拟杆菌门、放线菌门和浮霉菌门, 共占细菌总量 98%以上。随着养殖时间增长, 蓝藻丰度所占比例逐渐减少, 而变形菌、拟杆菌和浮霉菌丰度逐渐增大, 其中少数几种蓝藻前期占优势, 但后期红杆菌、黄杆菌和腐螺旋菌逐渐占优。高密度池细菌种类和多样性指数平均值均高于低密度池, 养殖过程中细菌多样性指数均随时间逐渐提高。养殖前期高密度池浮霉菌丰度显著高于低密度池($P < 0.01$), 而其他菌群无显著差异。养殖期前 50 d 不同养殖密度水体细菌群落有较大差异, 而后 30 d 内细菌群落的时间异质性大于空间异质性, 这表明到养殖后期菌相快速转变, 养殖密度所带来的影响被减弱。

参考文献:

- [1] FAO. 2011 Fishery and Aquaculture Statistics[M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- [2] Li Y Q, Li J, Wang Q Y, et al. Effects of intensity-stress on the growth and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(9): 2091–2096. [李玉全, 李健, 王清印, 等. 密度胁迫对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫因子的影响[J]. 中国农业科学, 2007, 40(9): 2091–2096.]
- [3] Chen Y K, Guo R, Xia H, et al. Effects of density stress on *Litopenaeus vannamei* growth, and water quality factor and immunity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 292–294. [陈亚坤, 郭冉, 夏辉, 等. 密度胁迫对凡纳滨对虾生长、水质因子及免疫力的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 292–294.]
- [4] Zhang T S, Kong J, Liu P, et al. Effect of diet and stocking density on growth and survivorship of juvenile shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(3): 41–47. [张天时, 孔杰, 刘萍, 等. 饲料和养殖密度对中国对虾幼虾生长及存活率的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 41–47.]
- [5] Zhang G X. Effect of different stocking density on growth of *Litopenaeus vannamei*[J]. Hebei Fisheries, 2008(8): 12–15. [张国新. 不同养殖密度对南美白对虾生长的影响[J]. 河北渔业, 2008(8): 12–15.]
- [6] Yu H N. Effects of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2007. [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2007.]
- [7] Ding M L, Lin L, Li G Y, et al. Effects of organic pollution on *Penaeus chinensis* body's intra environment and external environment[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1997, 28(1): 7–11. [丁美丽, 林林, 李广友, 等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7–11.]
- [8] Chen W X. The effect of different rearing strategy on growth and N budget of *Penaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012. [陈文霞. 不同养殖策略对凡纳滨对虾生长、摄食与氮收支的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.]
- [9] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. Vet Microbiol, 2006, 114(3–4): 173–186.
- [10] Itoi S, Niki A, Sugita H. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Aquaculture, 2006, 256: 287–295.
- [11] Sugita H, Nakamura H, Shimada T. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish[J]. Aquaculture, 2005, 243: 403–409.
- [12] Zhu P, Ye Y F, Pei F F, et al. Characterizing the structural diversity of a bacterial community associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of *Scortum barcoo*[J]. Can J Microbiol, 2012, 58(3): 303–310.
- [13] Sun X, Gao Y, Yang Y F. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. Biodi-

- versity Science, 2013, 21(4): 393–400. [孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 393–400.]
- [14] Wasielesky W J, Atwood H I, Stokes A, et al. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2006, 258: 396–403.
- [15] Otoshi C A, Scott M S, Naguwa F C, et al. Super behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities[J]. Global Aquacult Advocate, 2007(2): 67–69.
- [16] Sandifer P A, Hopkins J S, Stokes A P. Intensification of shrimp culture in earthen ponds of South Carolina: progress and prospects[J]. J World Aquacult Soc, 1988, 21: 218–226.
- [17] Wyban J A, Sweeney J N, Kanna R A. Shrimp yields an economic potential intensive round system[J]. J World Aquacult Soc, 1988, 19: 210–217.
- [18] Lin Y C, Chen J C, Chen Y Y, et al. Crowding of white shrimp *Litopenaeus vannamei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 45: 104–111.
- [19] Wang C Z, Lin G R, Yan T, et al. Microbial community in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestine and its culture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 706–712. [王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及虾肠道微生物群落结构研究[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 706–712.]
- [20] Huang X H. Culture pollution and ecological control mechanisms using planktonic microalgae in high level prawn ponds[D]. Shanghai: Donghua University, 2013. [黄翔鹤. 对虾高位池水环境养殖污染和浮游微藻生态调控机制研究[D]. 上海: 东华大学, 2013.]
- [21] Stenholm A R, Dalsgaard I, Middelboe M. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(13): 4070–4078.
- [22] Qian Z S, Fu L, Ding J, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microbes in a hollow fiber membrane bioreactor[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2014, 44(11): 887–892. [钱祝胜, 付亮, 丁静, 等. 中空纤维膜生物反应器富集反硝化厌氧甲烷氧化菌群的研究[J]. 中国科学技术大学学报, 2014, 44(11): 887–892.]
- [23] Tang J X, Wang Z W, Ma J X, et al. Identifying predominant strains causing membrane biofouling by using 454 high-throughput pyrosequencing[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 391–398. [唐霁旭, 王志伟, 马金星, 等. 454 高通量焦磷酸测序法鉴定膜生物反应器膜污染优势菌种[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 391–398.]
- [24] Zhang X. Bacterial community structure analysis in typical aquaculture water by pcr-dgge technology and its correlation with environmental factors[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010. [张星. 典型养殖水体中细菌群落结构的 DGGE 分析及其与环境因子相关性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.]
- [25] Li J Y, Lin W T, Luo J F, et al. Community structure of microbes involved in nitrification and denitrification in typical shrimp-farming water[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(4): 478–488. [李敬源, 林炜铁, 罗剑飞, 等. 典型对虾养殖水体中参与硝化与反硝化过程的微生物群落结构[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 478–488.]

Dynamics of the bacterial community in rearing water from an intensive pond containing different stocking densities of *Litopenaeus vannamei*

CHEN Chen^{1,2}, YAN Maocang^{1,2}, ZHANG Xiang^{1,2}, YU Junqi^{1,2}, CHAI Xueliang^{1,2}, ZENG Guoquan^{1,2}

1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bioresource, Wenzhou 325005, China

Abstract: Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is the most popular shrimp species cultured worldwide. Previous studies have indicated that high stocking densities negatively affect growth and survival rates, production, water quality, and immune parameters but promote disease outbreaks. Bacteria play a key role in organic contamination. However, little is known about the stress of stocking density on the rearing pond microbial community. Accordingly, the purpose of this investigation was to reveal the effect of shrimp stocking density on microbial community structure in intensive ponds as part of a recirculating aquaculture system. Water samples were collected from a high-density pond (200 ind/m²) and a low-density pond (133 ind/m²) every 15 days during the rearing period and filtered through 0.22- μ m polycarbonate filters to collect bacterial cells. Environmental genomic DNA was extracted from the membrane filters. The microbial communities were profiled by high-throughput sequencing of the V4–V5 hypervariable region of 16S rRNA gene using the MiSeq Illumina sequencing platform. The results showed that 1264 operational taxonomic units (OTUs) were obtained via high-throughput sequencing and bioinformatics analyses. The mean number of bacterial OTUs was higher in the high-density pond (549.4) than that in the low-density pond (431.8). Clear differences in relative abundance among bacterial phyla were detected in different samples. Five phylogenetic subgroups were the most dominant in the entire bacterial community, including Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Planctomycetes, accounting for >98% of all OTUs. The mean Shannon–Wiener diversity index for the high-density pond (4.36) was higher than that for the low-density pond (3.51), and bacterial diversity increased gradually over time in both rearing ponds. This result suggests that new dominant bacterial populations appeared from the high nutrient input during the later rearing period, leading to higher bacterial diversity at a higher nutrient level. The relative abundance of Planctomycetes was significantly higher in the high-density pond ($P < 0.01$) during the initial rearing period than that in the low-density pond, which may have contributed to degradation of more residual feed in the high-density pond. The multidimensional scaling plot and cluster analysis demonstrated that all samples grouped into three clusters, indicating clear differences in the bacterial community structure between the high- and low-density ponds during the initial 50 days of rearing. However, the bacterial communities in the two ponds were more similar during the late stage compared with the marked differences during the initial stage, suggesting an initial stage (days 0–50) and a late stage (days 50–80), based on bacterial community structure. The effect of different stocking densities on the bacterial community decreased during the late stage.

Key words: bacterial community; Pacific white shrimp; stocking density; intensive pond; high-throughput sequencing; 16S rRNA gene

Corresponding author: ZHANG Xiang. E-mail: jhon618@sohu.com