

## 健康和患病凡纳滨对虾幼虾消化道菌群结构的比较

杨坤杰<sup>1</sup>, 王欣<sup>2\*</sup>, 熊金波<sup>1,3</sup>, 裘钱玲琳<sup>1</sup>, 黄雷<sup>1</sup>,  
张化俊<sup>1</sup>, 郭安南<sup>1</sup>, 李来国<sup>4</sup>, 张德民<sup>1,3</sup>

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211;

2. 宁波大学医学院, 浙江宁波 315211;

3. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江宁波 315211;

4. 宁波市鄞州瞻岐椿霖养殖场, 浙江宁波 315145)

**摘要:** 凡纳滨对虾养殖过程中, 早期阶段是病害易感阶段, 而消化道菌群结构与对虾健康关系密切。因此, 探讨幼虾的消化道菌群尤其是弧菌类细菌与对虾发病的关系对病害有效防治具有重要意义。本实验采用Illumina测序研究了凡纳滨对虾健康和患病幼虾的消化道细菌群落结构, 并基于纯培养和16S rDNA, *recA*和*pyrH*基因序列比对, 分析了幼虾消化道中弧菌的主要种类组成。结果发现, 健康幼虾消化道中 $\alpha$ -变形菌纲和厚壁菌门丰度较高, 而患病幼虾中 $\gamma$ -变形菌纲、拟杆菌门、放线菌门和 $\beta$ -变形菌纲较高, 其中放线菌门丰度差异显著。基于科水平的响应比分析, 发现患病幼虾消化道中动性球菌科和噬菌弧菌科的丰度显著降低, 而弧菌科的丰度显著升高。相似度分析发现, 驱动群落变异的OTU主要来源于弧菌属、海洋杆状菌属、冷杆菌属、假交替单胞菌属以及未分类至属的红杆菌科和微杆菌科。健康幼虾消化道弧菌组成以锡那罗亚州弧菌为主, 而患病幼虾消化道弧菌组成以坎氏弧菌为主。尽管健康和患病幼虾消化道内细菌群落结构整体差异不显著, 但一些重要类群丰度变化显著, 其特征与已知的生态功能一致。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 消化道菌群; Illumina测序; 弧菌; 病害

**中图分类号:** S 968.2

**文献标志码:** A

随着现代集约化和规模化水产养殖业的发展, 病害频发已成为制约凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖业发展的瓶颈<sup>[1-2]</sup>。虽然近年来凡纳滨对虾病毒性病害的报道很多, 但是细菌性病害仍然是养殖对虾的重要。由于凡纳滨对虾消化道和肝胰腺易受病原菌侵染, 而对虾消化道菌群在抵御病害方面有着至关重要的作用, 不仅能够促进宿主对营养物质消化吸收更能保护机体免受病原菌侵染<sup>[3]</sup>。因此, 研究消化道微生物组成变化与凡纳滨对虾健康状况的相关性对促使对虾养殖病害防控从被动处置到主动防御的转变具有重要意义。

以往研究表明, 成年健康和患病凡纳滨对虾消化道细菌类群的变化可用于指示对虾的健康状况, 其中对虾健康指示类群有酸微菌科(Acidimicrobiaceae)、红杆菌科(Rhodobacteraceae)和拟杆菌科(Bacteroidaceae)等, 患病指示类群有腐螺旋菌科(Saprospiraceae)和浮霉状菌科(Planctomycetaceae)<sup>[4]</sup>。有报道发现, 日本对虾(*Penaeus japonicus*)幼虾消化道中弧菌属(*Vibrio*)占主导, 而成年虾消化道中假单胞菌属(*Pseudomonas*)占优势<sup>[5]</sup>。此外, 斑节对虾(*Penaeus monodon*)不同生长阶段对虾消化道内的优势类群也不尽相同<sup>[6]</sup>。因此, 不同种类对虾消化道微生物

收稿日期: 2015-10-14 修回日期: 2016-08-08

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA092001); 国家海洋局海洋资源生物种质资源库建设项目(12PYY001SF08-NBDX-1); 浙江省应用公益性项目(2016C32063); 浙江省重中之重学科开放基金(XKZSC1421)

通信作者: 王欣, E-mail: wangxin@nbu.edu.cn

群落结构特征不仅与健康状况密切相关<sup>[4]</sup>,也受到不同生长阶段的影响<sup>[5-8]</sup>。以往的研究主要集中在成年凡纳滨对虾的消化道细菌群落组成<sup>[4, 9-10]</sup>,而缺乏对幼虾消化道细菌组成的研究。因此,对于能否利用凡纳滨对虾幼虾消化道细菌群落来评价幼虾的健康状况还不明确。

此外,病原菌(尤其是弧菌)对宿主以及对虾消化道细菌组成有很大影响。在成年斑节对虾养殖病害暴发期,霍乱弧菌(*V. cholerae*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)是养殖池和肝胰腺中最主要的弧菌种群<sup>[11]</sup>;而Ruwandeeepika等<sup>[12]</sup>认为,哈维弧菌群是水产养殖中最重要的病原性细菌,且其致病性远比其他弧菌类群高。以往研究也发现,凡纳滨对虾养殖后期弧菌病的暴发越来越严重<sup>[4]</sup>,但对于凡纳滨对虾幼虾发病是否也由弧菌病原菌引起仍需要进一步验证。现有关于不同种类对虾幼虾消化道菌群多样性的研究主要分析可培养细菌<sup>[11-13]</sup>,不能全面反映对虾幼虾的消化道细菌群落组成特征,因为99%以上的细菌是不可培养的<sup>[6]</sup>。近年出现的高通量测序技术(如454测序和Illumina测序)<sup>[14-15]</sup>则可克服这个缺点,全面揭示全部细菌的多样性,且测序通量提高百万倍。因此,本研究利用Illumina测序技术比较健康和患病幼虾消化道细菌群落差异,同时对比健康和患病幼虾消化道中弧菌的组成差异,确定幼虾患病的潜在致病弧菌,为对虾健康养殖和病害防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验幼虾样品采自浙江省宁波市椿霖水产养殖场(29°31'N, 121°31'E)。该养殖场有34个长方形的高位池水泥底池塘,养殖水深1.8 m,面积约2000 m<sup>2</sup>,每个池塘的日换水率和日常管理措施相同。养殖场于2014年3月25日放苗,在4月15日有3个塘的虾出现发病症状,幼虾体色为黄褐色,肝胰腺萎缩,出现厌食和大量死虾现象。在发病当天(第21天),于每个发病养殖池分别采集了健康幼虾和濒死幼虾,存活状态下于2 h内带回实验室处理。

### 1.2 幼虾消化道弧菌计数及DNA提取

从带回的活体幼虾样品中,根据其肝胰腺

和肠道及外观将之分为健康和患病幼虾。健康幼虾胃肠半透明色,体表光滑;患病幼虾胃肠灰白色,组织松软,眼睛凹陷。每个塘健康和患病幼虾各取1只,体长约2 cm,体质量约1 g。用75%的酒精擦拭幼虾体表进行消毒,再用无菌海水洗涤3次,无菌操作条件下将幼虾用0.85%无菌生理盐水研磨,此方法得到的细菌可代表幼虾消化道细菌<sup>[16-17]</sup>。然后用生理盐水梯度稀释,在弧菌选择性琼脂培养基(硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖, TCBS)上涂布,每个梯度设置3个平行,培养24 h后统计每尾健康和患病幼虾弧菌菌落数(CFU)。同时,将上述制成的幼虾研磨液用QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit(Qiagen)试剂盒提取DNA,用NanoDrop ND-1000分光光度计(NanoDrop Technologies)测定DNA浓度和纯度,DNA样品于-80 °C保存备用。

### 1.3 幼虾消化道弧菌分离株的分子鉴定

从弧菌计数TCBS平板上挑取弧菌菌落,在盐度为20的LB培养基上进一步划线分离纯化,用水煮法提取DNA,用通用引物对27F-1492R PCR扩增其16S rRNA基因。50 μL扩增体系:超纯水34.75 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix (2.5 mmol)4 μL, 上游引物2 μL, 下游引物2 μL, DNA 2 μL, *rTaq* 0.25 μL。扩增条件:94 °C 3 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 30个循环后72 °C延伸10 min。使用弧菌通用*recA*基因和*pyrH*基因引物进行PCR扩增<sup>[18]</sup>。其50 μL扩增体系:超纯水33.75 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix(2.5 mmol)4 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL, DNA 5 μL, *rTaq* 0.25 μL。扩增条件:95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 2 min 15 s, 72 °C 1 min 15 s, 3个循环; 95 °C 35 s, 55 °C 1 min 15 s, 72 °C 1 min 15 s, 30个循环; 72 °C 7 min。电泳检测无杂带的PCR产物纯化后送上海桑尼公司测序,将测序结果与NCBI上基因序列库中的弧菌模式菌株比对,通过与模式菌株的相似性初步判定所对应的最相近弧菌菌株的种属。

### 1.4 幼虾消化道细菌群落高通量测序

取50 ng幼虾消化道DNA作为PCR的模板,扩增16S rRNA基因的V4可变区,上下游引物分别

为515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。上下游引物的5'端各带有6-bp的Barcode序列用于区分样品。PCR反应体系为30  $\mu$ L, 包括Master Mix (2 $\times$ ) 15  $\mu$ L, 引物(2  $\mu$ mol)3  $\mu$ L, DNA模板(1 ng/ $\mu$ L) 10  $\mu$ L, MO BIO PCR水2  $\mu$ L。反应条件: 98  $^{\circ}$ C预变性1 min, 98  $^{\circ}$ C变性10 s, 50  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C扩增30 s, 25个循环; 2  $^{\circ}$ C延伸5 min。每个样品设置3个PCR重复, 以减少扩增过程中造成的偏差。将每个样品的3个重复PCR产物混合后用纯化试剂盒(TaKaRa, 日本)纯化。每个样品PCR产物等量混合, 在Illumina MiSeq平台(Novogene, 北京)上双向测序。

### 1.5 高通量测序数据的处理及统计分析

测序数据在Qiime平台(quantitative insights into microbial ecology, <http://qiime.org>)经过质控处理后除去嵌合体、叶绿体和古菌序列<sup>[19]</sup>。应用Uclust将相似性大于97%的序列归为同一个分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)<sup>[20]</sup>, 并通过Greengenes数据库<sup>[21]</sup>确定各个OTU的分类地位。为了避免由于测序深度不同造成的偏差, 每个样品随机选取16 400条序列(所有样品中的最低序列数)进行分析。

采用基于Bray-Curtis距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)评估群落结构的整体差异, 并用Past软件进行群落相似性差异显著性检测(One-Way ANOSIM)。在Prime 5.0中

计算细菌Shannon Wiener指数、丰富度Pielou's evenness和Simpson指数, 用T-test检验幼虾消化道中细菌群落多样性和丰富度之间的差异。通过响应比分析(response ratio)<sup>[4]</sup>筛选出在健康和患病幼虾消化道中差异显著的科水平菌群。用相似度(Simper)分析筛选出造成消化道细菌群落组成差异的主要OTU。

## 2 结果

### 2.1 幼虾消化道细菌群落组成及多样性

在门/纲(变形菌门各纲)水平上, 幼虾消化道细菌群落组成主要(相对丰度>1%)为:  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)(图1-a), 占细菌总数的98%以上。与患病幼虾相比, 健康幼虾消化道中放线菌门细菌丰度较高(1.45%vs. 3.59%,  $P=0.017$ ), 其他各门/纲差别不显著。

利用PCoA主坐标分析比较消化道细菌群落组成, 发现健康和患病幼虾消化道细菌群落主要沿第一轴分布, 其一轴和二轴解释度分别为55.7%和20.7%(图1-b)。但是, 基于样品间的Bray-Curtis距离进行群落相似性检测, 健康和患病幼虾消化道群落之间差异不显著。

消化道细菌群落多样性和均匀度在健康幼虾中均高于患病幼虾(表1), 但差异未达到显著水平。

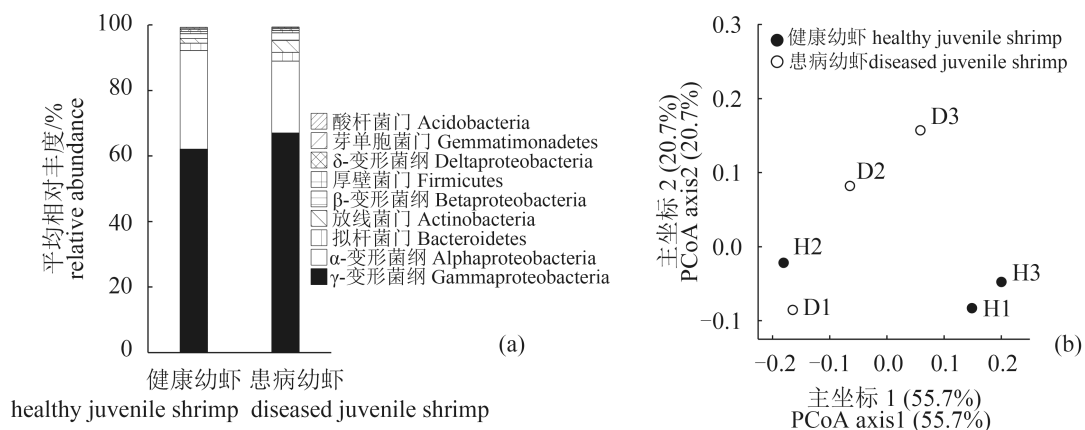


图1 健康和患病幼虾消化道细菌优势(>1%)门/纲类平均相对丰度(a)和群落组成的主坐标分析(基于Bray-Curtis距离)图(b)

Fig. 1 The relative abundance of dominant (>1%) phyla/classes (a) and community composition (based on Bray-Curtis distance) (b) in healthy and diseased juvenile shrimp digestive tract

表 1 健康和患病幼虾消化道中细菌群落α-多样性  
 Tab. 1 The alpha-diversity of bacterial communities in healthy and diseased juvenile shrimp digestive tract

	香农指数 Shannon-Wiener	辛普森指数 Simpson	均匀度指数 Pielou's evenness
健康幼虾 healthy juvenile shrimp	3.59±0.58	0.68±0.10	0.37±0.05
患病幼虾 diseased juvenile shrimp	3.55±0.92	0.63±0.16	0.36±0.09

2.2 健康和患病幼虾消化道中差异显著的细菌科属

通过响应比分析, 筛选出18个在健康和患病幼虾消化道中丰度差异显著( $P < 0.05$ )的细菌科(图2), 其中芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)、噬菌弧菌科(Bacteriovoracaceae)、酸微菌目(unclassified Acidimicrobiales)和土壤红杆菌目(unclassified Solirubrobacterales)的未分类至科的成员、微杆菌科(Microbacteriaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)、动性球菌科(Planococcaceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)和脱硫葱状菌科(Desulfobulbaceae)在健康幼虾消化道中的丰度显著高于患病幼虾; 而弧菌科(Vibrionaceae)、 $\gamma$ -变形菌纲(unclassified Gammaproteobacteria)、N1423WL目(unclassified N1423WL)、Ellin6067目(unclassified Ellin6067)和螺杆菌目(unclassified Spirobacillales)未分类至科

的成员以及侏囊菌科(Nannocystaceae)、弯曲菌科(Campylobacteraceae)、嗜油菌科(Oleiphilaceae)则在患病幼虾消化道中的丰度显著升高。

相似度分析结果表明, 健康和患病幼虾消化道细菌群落的差异度为30.07%。对群落差异度贡献较大的8个OTU(贡献率 >1%)累积贡献率达到56.04%, 其中有红杆菌科(unclassified Rhodobacteraceae)未分类至属的OTU 3个, 弧菌属、红杆菌科的海军杆状菌属(*Marivita*)、冷杆菌属(*Cryobacterium*)、微杆菌科(Microbacteriaceae)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的OTU各1个(图3)。患病幼虾消化道中弧菌属、海洋杆状菌属、冷杆菌属、微杆菌科和假交替单胞菌属的OTU平均丰度高于健康幼虾, 而在健康幼虾消化道中未分类至属的红杆菌科OTU平均丰度高于患病幼虾。

2.3 幼虾消化道可培养弧菌的种类组成

通过将健康和患病幼虾菌悬液分别涂布, 健康幼虾消化道中弧菌总数为 $(1.56 \pm 0.39) \times 10^5$  CFU/尾, 患病幼虾中弧菌总数为 $(8.89 \pm 0.89) \times 10^5$  CFU/尾, 患病幼虾消化道中可培养弧菌总数显著高于健康幼虾( $P = 0.019$ )。

用TCBS培养基得到健康幼虾弧菌分离株24株, 患病幼虾弧菌分离株24株, 共计48株。基于16S rRNA基因、*recA*和*pyrH* 3个基因的序列与NCBI上模式菌株序列比对发现: 健康幼虾消化

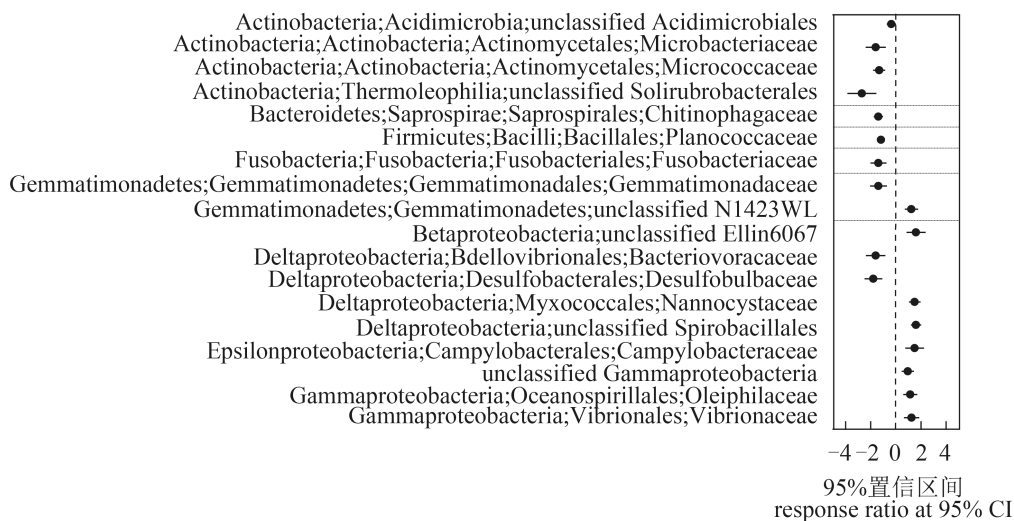


图 2 健康和患病幼虾消化道中在科水平显著差异的细菌类群(在95%置信区间)

Fig. 2 Bacterial families that exhibited significant variation in relative abundance between healthy and diseased juvenile shrimp digestive tract (at a 95% confidence interval)

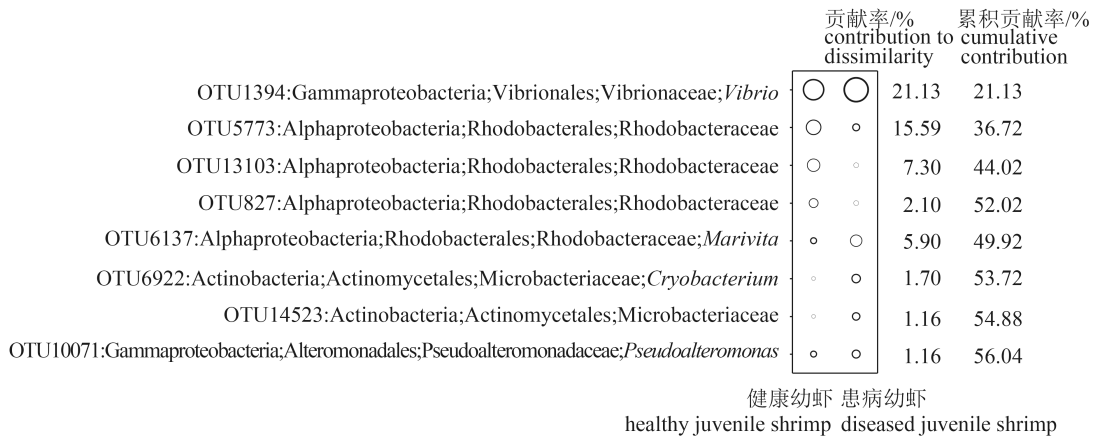


图 3 造成健康和患病幼虾消化道细菌群落变异的关键OTU(圆圈直径大小与该细菌相对丰度成正比)

Fig. 3 The main OTUs driving the changes of bacterial communities in healthy and diseased juvenile shrimp digestive tract (the diameter of the circle is proportional to the abundance of a given bacterial OTU in samples)

道优势弧菌为锡那罗亚州弧菌(*V. sinaloensis*), 占健康幼虾弧菌分离株总数的45.8%; 其次是欧文弧菌(*V. owensii*), 占25.0%; 另有3株坎氏弧菌(12.5%)及天蓝色弧菌(*V. azureus*)、徐氏弧菌(*V. xuii*)、纳瓦拉弧菌(*V. navarrensis*)、强壮弧菌(*V. fortis*)各1株(分别占4.2%)。患病幼虾消化道优势弧菌为坎氏弧菌(*V. campbellii*), 占患病幼虾弧菌分离株总数的54.2%; 其次是纳瓦拉弧菌(*V. navarrensis*), 占20.8%; 锡那罗亚州弧菌和欧文斯弧菌各2株(分别占8.3%); 肝弧菌和徐氏弧菌各1株(分别占4.2%)(表2)。可见, 可培养弧菌在健康和患病幼虾消化道内的组成明显不同。

### 3 讨论

本实验采用Illumina测序技术比较了凡纳滨对虾健康和患病幼虾消化道细菌群落结构和多样性, 并用培养法比较了幼虾消化道优势弧菌组成, 发现健康和患病幼虾消化道细菌群落结构和多样性发生变化, 特别是在弧菌丰度和种类组成上都明显不同。

从多样性分析来看, 香农指数是一种被认为能较好反映物种多样性的指数, 但是不同学者使用的多样性指数不同, 其实验结果也存在差异<sup>[22-23]</sup>。本实验分析了凡纳滨对虾幼虾肠道细

表 2 健康和患病幼虾消化道弧菌种类组成比较

Tab. 2 Comparison of *Vibrio* composition in healthy and diseased juvenile shrimp digestive tract

分群 clade	最相近菌种 most similar species	分离菌株数 number of isolates						合计 total	
		H1	H2	H3	D1	D2	D3	H	D
侧柏弧菌群 <i>Orientalis</i>	锡那罗亚州弧菌 <i>V. sinaloensis</i>	6	2	3		2		11	2
侧柏弧菌群 <i>Orientalis</i>	肝弧菌 <i>V. hepatarius</i>						1		1
哈维弧菌群 <i>Harveyi</i>	欧文斯弧菌 <i>V. owensii</i>		2	4		2		6	2
哈维弧菌群 <i>Harveyi</i>	坎氏弧菌 <i>V. campbellii</i>	1	2		8	4	1	3	13
哈维弧菌群 <i>Harveyi</i>	天蓝色弧菌 <i>V. azureus</i>			1				1	
沙蚕弧菌群 <i>Nereis</i>	徐氏弧菌 <i>V. xuii</i>		1				1	1	1
创伤弧菌群 <i>Vulnificus</i>	纳瓦拉弧菌 <i>V. navarrensis</i>		1				5	1	5
灿烂弧菌群 <i>Splendidu</i>	强壮弧菌 <i>V. fortis</i>	1						1	
总计 total								24	24

注: H和D分别代表健康幼虾和患病幼虾

Notes: H and D represent the healthy and diseased juvenile shrimp respectively

菌群落的香农指数、辛普森指数和均匀度指数,发现健康幼虾消化道多样性指数都高于患病幼虾,但差异不显著(表1)。其原因可能包括:①所采样点重复数( $n=3$ )不够,难以区分组内和组间差异;②所谓健康幼虾实际上也已不健康,只是程度较轻,症状不明显而已。群落多样性降低往往会导致群落功能的稳定性降低,致使幼虾对外界环境的应激能力下降,进而降低了对病原菌的抵抗能力,从而引起养殖对虾发病<sup>[24]</sup>。

通过响应比分析筛选出健康和患病幼虾消化道中相对丰度显著差异的18个细菌科(图3)。与健康幼虾消化道细菌科相比,弧菌科在患病幼虾消化道内的相对丰度显著升高,而芽孢杆菌目未知科和 $\delta$ -变形菌纲的噬菌弧菌科相对丰度显著降低(图2)。这种变化趋势与这些菌已知的功能相一致,例如弧菌作为水产养殖中最常见的病原菌,其在水体或虾肠道中丰度的升高,常被看作是对虾病害暴发的重要预警指标<sup>[4, 8-9, 25]</sup>。芽孢杆菌(*Bacillus*)作为水产养殖中常用的益生菌之一,其抗菌谱广泛,对多种病原弧菌以及其他细菌的生长均有较强的抑制作用<sup>[26]</sup>。一些芽孢杆菌还能产生多种酶类和多糖,故在一定程度上可促进对虾的生长和提高非特异性免疫功能<sup>[26-27]</sup>。此外,患病幼虾消化道中噬菌弧菌科的数量显著降低,而噬菌弧菌类细菌是能裂解和“吃掉”病原菌的一类细菌,且对致病菌的裂解能力明显大于非致病菌,尤其是消化道内病原菌更易被裂解<sup>[28]</sup>。储卫华等<sup>[29]</sup>研究表明,蛭弧菌(*Bdellovibrio*)对副溶血弧菌有较强的裂解和净化作用,能有效地预防对虾弧菌病的发生。此外,很多研究利用蛭弧菌净化污染水体,消除其中的致病性弧菌和大肠杆菌等<sup>[28, 30]</sup>。幼虾消化道细菌群落中芽孢杆菌和噬菌弧菌科数量的显著降低导致幼虾消化道菌群失调,使对虾消化道菌群对致病弧菌的拮抗能力降低,从而致使幼虾更易发病。

与健康幼虾相比,患病幼虾消化道弧菌属细菌在丰度和种类组成上都发生了明显变化。患病幼虾消化道中的弧菌丰度明显高于健康幼虾,是健康和患病幼虾消化道细菌群落差异的主要驱动类群(贡献度高达21.03%)(图3),可培养弧菌计数的结果也证实患病幼虾明显高于健康对虾( $8.89 \times 10^5$  CFU vs.  $1.56 \times 10^5$  CFU)。健康与患病幼虾在弧菌种类组成上也明显不同。据报道,坎氏弧菌对对虾虾苗有很强的致病性<sup>[16]</sup>,而从患病

幼虾中分离的弧菌中,坎氏弧菌占比超过一半(表2)。纳瓦拉弧菌在患病幼虾消化道也是优势弧菌,可能也是潜在的病原菌<sup>[31-32]</sup>。健康幼虾消化道优势弧菌为锡那罗亚州弧菌,占比接近一半。锡那罗亚州弧菌是消化道中常见的一种弧菌,纯培养的锡那罗亚州弧菌对对虾幼苗有微弱毒性<sup>[17]</sup>,但其同时具有淀粉酶活性,对促进宿主消化吸收和免疫有重要作用<sup>[33-34]</sup>,在细菌群落中的作用可能是益大于害。通过调控锡那罗亚州弧菌在对虾肠道中的数量能否增强其抵抗强致病弧菌(如坎氏弧菌或副溶血弧菌等)的侵染,是一个有意思的问题,相关工作正在进行中。如能得到正面结果,将为评价对虾健康状况、研发对虾病害主动防御措施提供指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 杨少丽,王印庚,董树刚.海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J].海洋水产研究,2005,26(4):75-83.  
YANG S L, WANG Y G, DONG S G. Progress of research on *Vibriosis* in marine cultured fish[J]. Marine Fish Research, 2005, 26(4): 75-83(in Chinese).
- [2] Zhou J, Fang W, Yang X, *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.
- [3] Boirivant M, Amendola A, Butera A. Intestinal microflora and immunoregulation[J]. Mucosal Immunology, 2008, 1: S47-S49.
- [4] Xiong J, Wang K, Wu J, *et al.* Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015: 6911-6919.
- [5] Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate[J]. Aquaculture, 1980, 19(3): 229-234.
- [6] Rungrasamee W, Klanchui A, Chaiyapechara S, *et al.* Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages[J]. PloS One, 2013, 8(4).
- [7] 马甦,于明超,李卓佳.虾类消化道菌群研究进展[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2008,37(6):889-893.  
MA S, YU M C, LI Z J. A review of studies on the effects and influencing factors of microflora in the digestive tract of shrimp[J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2008, 37(6): 889-893(in Chinese).
- [8] Xiong J, Zhu J, Wang K *et al.* The temporal scaling of

- bacterioplankton composition: high turnover and predictability during shrimp cultivation[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67 (2): 256-264.
- [9] Zhang D, Wang X, Xing J, *et al.* Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status[J]. *Ecological Indicators*, 2014, 38: 218-224.
- [10] Xiong J, Zhu J and Zhang D. The application of bacterial indicator phylotypes to predict shrimp health status[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (14): 8291-8299.
- [11] 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): 101-110.
- [12] Ruwandeepika D, Arachchige H, Sanjeewa Prasad Jayaweera T, *et al.* Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of *Vibrios* belonging to the *Harveyi* clade[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 59-74.
- [13] 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.  
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(in Chinese).
- [14] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2008, 9: 387-402.
- [15] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [16] 李筠, 吕艳, 李军, 等. 苗期中国对虾幼体异养细菌区系及其变化与病害发生的关系[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(6): 1003-1007.  
LI Y, LU Y, LI J, *et al.* Study of heterotrophic bacterial flora, dominant *vibrios* composition of larvae and post larvae of *Penaeus chinensis* and its relationship with disease[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2004, 34(6): 1003-1007(in Chinese).
- [17] Zheng Y, Yu M, Liu Y, *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages[J]. *Aquaculture*, 2015.
- [18] Thompson F L., Gevers D., Thompson C C., *et al.* Phylogeny and molecular identification of *vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 5107-5115.
- [19] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [20] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [21] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Keller K, *et al.* NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(2): W394-W399.
- [22] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [23] Bending G D, Turner M K, Jones J E. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(8): 1073-1082.
- [24] Sullam K E, Essinger S D, Lozupone C A, *et al.* Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(13): 3363-3378.
- [25] 王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及对肠道微生物群落结构研究[J]. *水产学报*, 2014, 38 (5): 706-712.  
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(in Chinese).
- [26] 丁贤, 李卓佳, 陈永青, 等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2005, 11(6): 580-584.  
Ding X, Li Z J, Chen Y Q, *et al.* Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 11(6): 580-584.
- [27] Boopathy R, Kern C, Corbin A. Use of bacillus

- consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2015.
- [28] 王丽娜, 吴联熙. 蛭弧菌的噬菌特性及其在水污染检测和控制在应用中的研究进展[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(1): 54-57.
- WANG L N, WU L X. Phagocytosis characteristics of the *Bdellovibrio* and its research progress in water pollution detection and control applications[J]. *Microbiology*, 1994, 21(1): 54-57(in Chinese).
- [29] 储卫华, 朱卫, 康春涛. 海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 20-24.
- Chu W H, Zhu W, Kang C T. Isolation, identification of marine *Bdellovibrios* and its effect on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology*, 2009, 36(1): 20-24(in Chinese).
- [30] 宋志萍, 蔡俊鹏, 王志, 等. 蛭弧菌的分离及其生长条件和裂解能力的研究[J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 571-575.
- Song Z P, Cai J P, Wang Z, *et al.* Study of bacteria-lysis abilities and growth conditions of *Bdellovibrio*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 571-575(in Chinese).
- [31] Gladney L M, Tarr C L. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio navarrensis* isolates associated with human illness[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014: 01544-14.
- [32] Janda J M, Newton A E, Bopp C A. *Vibriosis*[J]. *Clinics in laboratory medicine*, 2015, 35(2): 273-288.
- [33] Gomez-Gil B, Fajer-Avila E, Pascual J, *et al.* *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(7): 1621-1624.
- [34] Tzuc J T, Escalante D R, Herrera R R, *et al.* Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Springer Plus*, 2014, 3(1): 280.



## Comparison of the bacterial community structures between healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive tract

YANG Kunjie<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>2\*</sup>, XIONG Jinbo<sup>1,3</sup>, QIU Qianlinglin<sup>1</sup>, HUANG Lei<sup>1</sup>,  
ZHANG Huajun<sup>1</sup>, GUO Annan<sup>1</sup>, LI Laiguo<sup>4</sup>, ZHANG Demin<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ministry of Education, Ningbo 315211, China;

2. Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

3. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and  
Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China;

4. Chunlin Aquaculture Company, Ningbo 315145, China)

**Abstract:** The early stage of shrimp aquaculture is susceptible to bacterial infection and the bacterial community structure in digestive tract is highly associated with shrimp health. Therefore, it is of great significance to explore the relation between shrimp bacterial community of digestive tract and juvenile shrimp disease. We investigated the intestinal bacterial community composition of healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by using Illumina sequencing, and explored *Vibrio* diversity based on 16S rDNA, *recA* and *pyrH* gene sequences of *Vibrio* isolates. The results showed that the average relative abundances of Alphaproteobacteria and Firmicutes are higher in healthy juvenile shrimp digestive tract than those in diseased one, while these of Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Betaproteobacteria exhibited an opposite pattern and the variation in Actinobacteria is significant. In addition, response ratio analysis at the bacterial family level shows that the relative abundances of Planococcaceae and Bacteriovoracaceae families significantly decreased, while that of Vibrionaceae remarkably increased in diseased juvenile shrimp digestive tract in relation to healthy one. Similarity percentage (SIMPER) analysis revealed that the main contribution to the variation of intestinal bacterial community structure between healthy and diseased shrimp is attributed to 8 OTUs affiliated with *Vibrio*, unclassified Rhodobacteraceae, *Marivita*, *Cryobacterium*, unclassified Microbacteriaceae and *Pseudoalteromonas*. As to *Vibrio* assemblage composition, we found that culturable *V. sinaloensis* strains were the dominant species in healthy juvenile shrimp digestive tract, while *V. campbellii* is dominant in diseased juvenile shrimp.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; digestive tract bacterial community; Illumina sequencing; *Vibrio*; disease

**Corresponding author:** WANG Xin. E-mail: wangxin@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National High Technology Research and Development Program of China (2012AA092000); Genetic Resources Center for Marine Pharmaceutical Organism (12PYY001SF08-NBDX-1); Zhejiang Province Public Welfare Technology Application Research Project (2016C32063); Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture (XKZSC1421)