

文章编号: 1000-0615(2017)05-0766-09

DOI: 10.11964/jfc.20150409862

饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响

唐 杨^{1,2}, 刘文亮^{1,2}, 宋晓玲^{2*}, 张晓静^{2,3}, 张盛静^{1,2}, 黄 健²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 农业部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了研究外源补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响, 以基础饲料为空白组, 在基础饲料中添加蜡样芽孢杆菌活菌作为实验组(活菌含量为 10^8 CFU/g), 每组4个平行, 在养殖场对凡纳滨对虾自幼苗至成虾进行一个完整养殖周期的养殖实验。选取养殖场中8个光照、位置等条件基本相同的养殖池分为2组, 空白组投喂基础饲料, 实验组投喂免疫饲料, 养殖周期95 d。期间在第45、52、59、66、73天采样, 称重并计算生长速率, 并取其肠道内容物提取DNA, 用16S rDNA序列V4区高通量测序方法检测对虾肠道内微生物群落的结构及变化情况。结果显示: ①投喂免疫饲料的实验组对虾生长速度比空白组平均快15.2%。②健康的凡纳滨对虾肠道微生物以变形菌门和拟杆菌门含量高, 厚壁菌门、疣微菌门、浮霉菌门、放线菌门含量较低。③空白组变形菌门平均含量(68.30%), 明显高于实验组平均含量(57.94%); 空白组拟杆菌门平均含量(23.58%)明显低于实验组平均含量(30.06%)。④变形菌门中以弧菌属、*Anaerospira*、小红卵菌属为主, 空白组弧菌属平均占总含量的5.40%, 实验组平均占总含量的1.94%; 拟杆菌门中以异养硝化菌属、粘着杆菌属为主, 实验组异养硝化菌属平均占总含量的8.12%, 空白组平均占含量的5.56%。研究表明, 饲料中添加蜡样芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾后可改变对虾肠道的微生物组成, 提高对虾生长速度。

关键词: 凡纳滨对虾; 蜡样芽孢杆菌; 肠道微生物; 高通量测序

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

近年来, 工厂化养殖逐渐兴起, 对虾工厂化养殖更是达到了前所未有的规模和产量。据中国渔业统计年鉴统计: 2012年我国的对虾养殖总产量共计158.9万t, 其中凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的养殖产量为142.9万t, 占对虾总产量的89.9%。随着养殖密度的增加、水环境的恶化及对虾种质的退化, 对虾疾病呈现暴发性态势, 从早期的对虾白斑综合征(white spot syndrome, WSS)、弧菌病到现在的偷死病(early mor-

tality syndrome, EMS)、急性肝胰腺坏死综合征(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)等, 疾病种类不断增加, 危害不断加强, 防控难度也越来越大。在养殖水体或对虾饲料中施用微生态制剂作为一种有效的方法得到了广泛的应用^[1-2]。不同的研究表明微生态制剂中的有益菌主要通过与病原菌的竞争抑制, 包括竞争结合位点和竞争营养物质; 分泌消化酶和营养物质; 改善宿主免疫系统; 改善水环境; 提高

收稿日期: 2016-04-30 修回日期: 2016-11-08

资助项目: 农业部引进国际先进农业科学技术计划(2016-XS6); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016HY-ZD0401)

通信作者: 宋晓玲, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

宿主抗病原感染能力等发挥作用^[3-5]。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是水产养殖业中应用最广泛的微生物制剂菌属之一^[6-9], 其中应用最多的包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)等。其中在对蜡样芽孢杆菌的研究中, 多数是在实验室规模和条件中进行, 其结果有一定的局限性。本实验选取在一个中等规模的凡纳滨对虾工厂化养殖场中进行, 并从放苗开始一直持续到对虾养殖到商品规格为止, 期间不仅研究了饲料中添加蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长速度的影响, 并通过高通量测序来研究在饲料中添加蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道微生物的影响, 旨在为对蜡样芽孢杆菌的系统研究及其在对虾养殖上的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 对虾及养殖

养殖实验在即墨某水产养殖场进行, 虾苗购自厦门新荣腾水产技术开发有限公司。虾苗体长(0.8±0.1) cm, 经套式PCR检测, 确认呈白斑综合征病毒阴性。该批虾苗一共放在82个水泥池中养殖, 每池30 m³水体, 挑选其中8个养殖条件(包括光照、位置等)基本相同的养殖池作为实验组(BG)和空白组(EG)单独管理, 实验组投喂免疫饲料, 空白组投喂基础饲料, 每日投喂4次, 日投喂量约占对虾体质量的10%~15%(根据对虾摄食情况调节投喂量); 每日8:00换水, 换水量约为30%~50%; 水温24~30 °C, 盐度(32±2), pH 8.2±0.4, 连续充气。养殖起始时间为2014年7月30日, 2014年11月5日达到商品规格上市, 养殖周期共95 d。

1.2 实验饲料制备

实验全过程选用大海跃牌饲料作为基础饲料, 将对虾防病益生菌制剂(由本实验室研发, 粉剂, 活菌总数≥1.0×10⁹ CFU/g, 其菌株为蜡样芽孢杆菌PC465)加水制作成悬浊液添加到基础饲料中, 悬浊液与饲料质量比为1:100, 晾干后再用1%褐藻酸钠溶液黏合, 经平板菌落计数后确认每克饲料中含有10⁸ CFU蜡样芽孢杆菌PC465活菌。

1.3 样本采集与处理

实验对虾生长状况的测定 在养殖第45、52、59、66、73天时分别对实验组和空白组采样, 每次取20尾, 去除最重5尾和最轻5尾, 计算平均体质量。

用于肠道菌群分析样品的采集及处理 在养殖第45、52、59、66、73天时分别对实验组和空白组采样, 每次取10尾, 空白组对应标号为EG1、EG2、EG3、EG4、EG5; 实验组对应标号为BG1、BG2、BG3、BG4、BG5。

采样的对虾用70%酒精擦拭体表, 在超净台中进行活体解剖, 取其完整肠道。解剖针挑开对虾肠道, 刮取肠道内壁, 收集肠道内容物。肠道浸于预冷PBS缓冲液中, 充分震荡, 于4 °C放置2~4 h, 800 r/min离心10 min, 取上清液于新的干净1.5 mL离心管中。肠道组织以预冷PBS清洗2~3次, 800 r/min离心10 min, 合并上清液。合并上清液后10 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 收集沉淀。将收集的肠道内容物和肠壁洗脱液中沉淀物混合后放于2 mL离心管, 混合物包含肠道内主要微生物^[10-11]。

对虾肠道内微生物DNA的提取及16S rDNA序列V4区高通量测序 用天根粪便组基因提取试剂盒对得到的混合物提取DNA, 将提取的DNA进行1.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并用Nanodrop对DNA的浓度和OD₂₆₀/OD₂₈₀值进行测定。将该10份DNA样本送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司, 基于Illumina MiSeq测序平台, 利用双末端测序(Paired-End)的方法, 构建小片段文库进行双末端测序。首先是PCR的扩增, 把样品用无菌水稀释至1 ng/μL。稀释后的基因组DNA为模板; 根据测序区域的选择, 使用带Barcode的特异引物; 使用New England Biolabs公司的Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer。使用高效和高保真的酶进行PCR, 确保扩增效率和准确性。引物对应区域为16S V4区引物515F-806R。PCR产物使用2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据PCR产物浓度进行等浓度混样, 充分混匀后使用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 使用Thermo Scientific公司的GeneJET胶回收试剂盒回收产物。最后使用New England Biolabs公司的NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina文库试剂盒进行文库

的构建, 构建好的文库经过Qubit定量和文库检测, 合格后, 使用MiSeq进行上机测序。用Uparse软件对所有样品的全部Effective Tags序列聚类, 将序列相近度达到97%的聚类成为一个OTU(operational taxonomic units)。以OTUs为基础进行聚类和物种分类分析。

数据分析与处理 实验采用SPSS16.0软件对实验数据进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 当差异显著($P < 0.05$)时用Duncan氏法作多重比较。

表1 养殖实验期间凡纳滨对虾的体质量变化情况

Tab. 1 The growth performance of *L. vannamei* in culture experiment

	时间/d time				
	45	52	59	66	73
EG体质量/g(10尾)	16.50±0.73 ^a	22.60±1.23 ^a	28.90±0.78 ^a	36.17±0.83 ^a	38.53±0.41 ^a
BG体质量/g(10尾)	20.20±0.75 ^b	25.90±0.08 ^b	34.97±0.82 ^b	37.50±0.22 ^b	45.60±0.29 ^b

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。EG: 空白组; BG: 实验组

Notes: The data with significant difference ($P < 0.05$) were indicated with different letters. EG: the control group; BG: the experimental group

2.2 对虾肠道内容物微生物DNA的提取与分析

DNA提取结果 本实验微生物DNA的提取用的是天根粪便组基因提取试剂盒, 提取后用Nonadrop测定其DNA浓度范围为25.5~234.2 ng/mL, OD₂₆₀/OD₂₈₀范围为1.27~1.95。对提取液进行1.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 主带清晰。

10份对虾肠道微生物DNA样本稀释曲线

从样品中随机抽取一定测序量的数据, 统计它们所代表物种数目(也即是OTUs数目), 以数据量与物种数来构建了10份对虾肠道微生物DNA样本的稀释曲线(图1)。从图1的Shannon曲线中可以看出, 当序列数大于2000时, 曲线趋向平坦, 说明测序数据量足够大, 可以反映样品中绝大多数的微生物信息。

2.3 对虾肠道内容物微生物DNA-16S rDNA中可变区V4区高通量测序及分析

OTU分析 用Uparse软件(Uparse v7.0.1001)对所有样品的全部Effective Tags序列聚类, 以97%的一致性将序列聚类成为OTUs。同一OTUs中的序列被视为是来源于某一个相同分类单元的序列, 作为一个假定的分类单元, 即把OTU作为生物信息学分析的基本操作分类单元。Uparse构建OTUs时会选取代表性序列(依据其算法原则, 筛选的是OTUs中出现频数最高的序

2 结果

2.1 凡纳滨对虾的生长速率

饲料中添加蜡样芽胞杆菌后, 养殖73 d与养殖45 d比较, 实验组体质量增长76.1%, 空白组体质量增长68.9%, 实验组生长速度高于空白组; 除了第66天, 实验组对虾体质量与空白组对虾体质量差异性显著, 实验组对虾体质量显著高于空白组对虾体质量, 实验组的生长速率比空白组平均快15.2%(表1)。

列), 将这些代表性序列集合用RDP Classifier与GreenGene数据库进行物种注释分析。不同的“门、纲、目、科、属”均由OTUs组成。

样本的物种间相似性分析 10份对虾肠道内容物DNA样本物种间相似性的双层聚类图(Heatmap)包括样本间聚类关系树和物种(OTU)丰

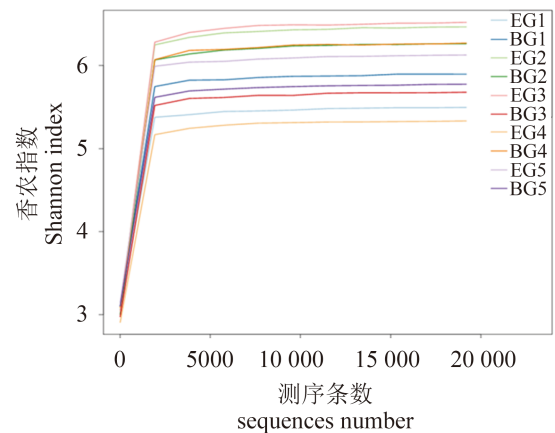


图1 10份对虾肠道微生物DNA样本的Shannon曲线 BG代表实验组, 根据不同时间节点命名为BG1、BG2、BG3、BG4、BG5; EG代表空白组, 根据不同时间节点命名为EG1、EG2、EG3、EG4、EG5, 以下注释同此

Fig. 1 Shannon curve of shrimp gut microbes DNA among ten samples

EG means the control group; BG means the experimental group. EG1, EG2, EG3, EG4, EG5 were named with different time, so as BG1, BG2, BG3, BG4, BG5, the same below

度相似性树。EG1和BG1相似性较高; BG2、BG3、BG5相似性较高; EG2、EG3、EG5、EG1相似性相对较低(图2)。结果表明: 养殖初期空白组和实验组肠道组成较为相似; 投喂蜡样芽孢杆菌的实验组在养殖中后期时其肠道微生物组成较稳定, 变化不是很大; 空白组在养殖中后期时肠道微生物组成变化较大。

不同实验节点对虾肠道微生物组成特征

实验对虾肠道内微生物主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)、放线菌门(Actinobacteria)组成, 其中变形菌门和拟杆菌门之和占到总量的近90%。在养殖第45、52、59、66、73天, 空白组变形菌门所占比例分别为66.2%、74.9%、68.4%、74.9%、57.1%; 空白组拟杆菌门所占比例分别为29.3%、16.7%、22.3%、22.4%、

27.2%; 实验组变形菌门所占比例分别为58.4%、60.6%、51.4%、59.4%、59.9%; 实验组拟杆菌门所占比例分别为31.7%、29.4%、38.9%、23.6%、26.7%。实验组变形菌门所占平均比例为57.94%, 明显低于空白组所占平均比例(68.30%); 实验组拟杆菌门所占平均比例为30.06%, 明显高于空白组所占平均比例(23.58%); 实验组疣微菌门所占平均比例为3.76%, 明显高于空白组所占平均比例(1.54%)(图3)。

变形菌门中主要以弧菌属、小红卵菌属和红杆菌科中的*Anaerospira*、*Thalassobius*等为主; 拟杆菌门中主要以异养硝化菌属和粘着杆菌属为主; 厚壁菌门主要以乳杆菌属和链球菌属为主; 疣微菌门主要以*Luteolibacter*为主; 浮霉菌门中主要以浮霉菌属为主。

把所有未命名的属集合到了一起, 并把相对丰度最高的十个属列出, 相对丰度比较高的

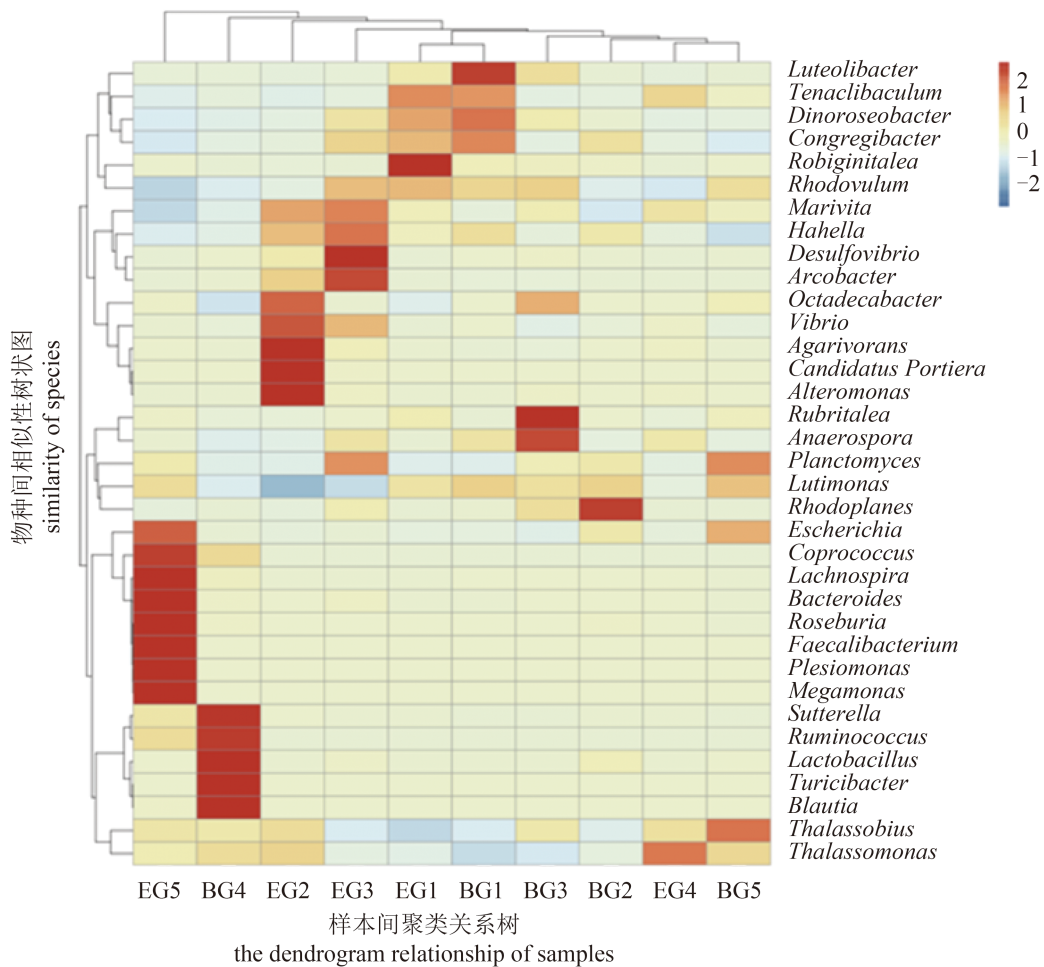


图 2 10份对虾肠道微生物DNA样本的细菌区系图

Fig. 2 Bacterial distribution of shrimp gut microbes DNA among ten samples

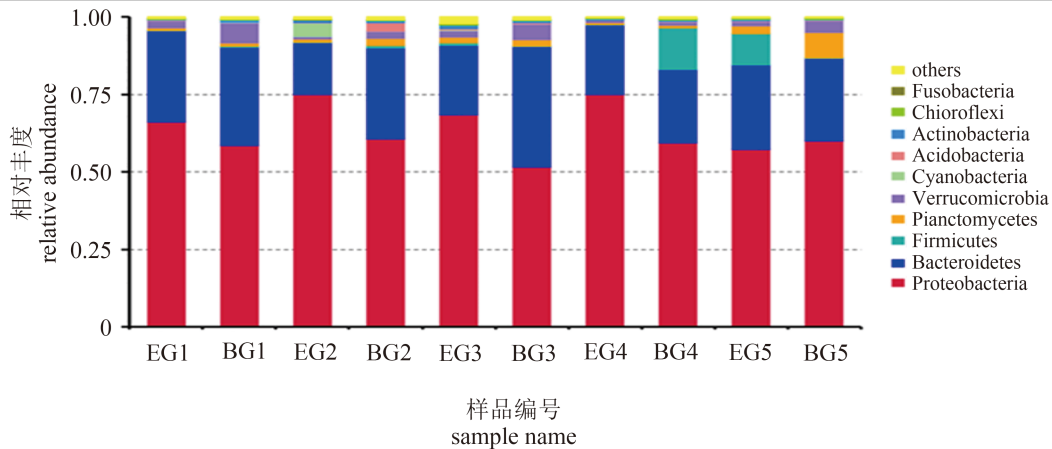


图3 以“门”为分类单元的多样本柱状图

未命名的“门”记为others

Fig. 3 Taxon with Phylum among the samples' histogram

unclassified Phylum as others

主要有弧菌属、异养硝化菌属、*Anaerospora*、小红卵菌属等(图4)。各门类均检测到多种未命名的“属”，将其命名为others。

实验第52天和59天，空白组弧菌属含量分别为11.80%、7.90%；实验组弧菌属含量分别为2.00%、1.20%；空白组异养硝化菌属含量分别为2.40%、3.80%；实验组异养硝化菌属含量分别为9.10%、8.00%。空白组弧菌属平均含量为5.40%，明显高于实验组的平均含量(1.94%)；空白组异养硝化菌属平均含量为5.56%，明显低于实验组的平均含量(8.12%)(图5)。

3 讨论

自1965年开始，日本就开始研究光合细菌在水产养殖中的应用并取得了巨大的成功，随后我国台湾地区也在应用微生态制剂方面取得了很好的效果。国内虽然在微生态制剂方面起步较晚，但也取得了非常瞩目的成就。益生菌的应用包括用益生菌制剂净化水质，改善水产动物养殖的生态环境；在养殖水体中施入益生菌，杀死或抑制病原微生物；以益生菌制剂作饲料添加剂，抑制有害微生物；用益生菌制剂强化水产动物饲料的营养，提高水产动物机体

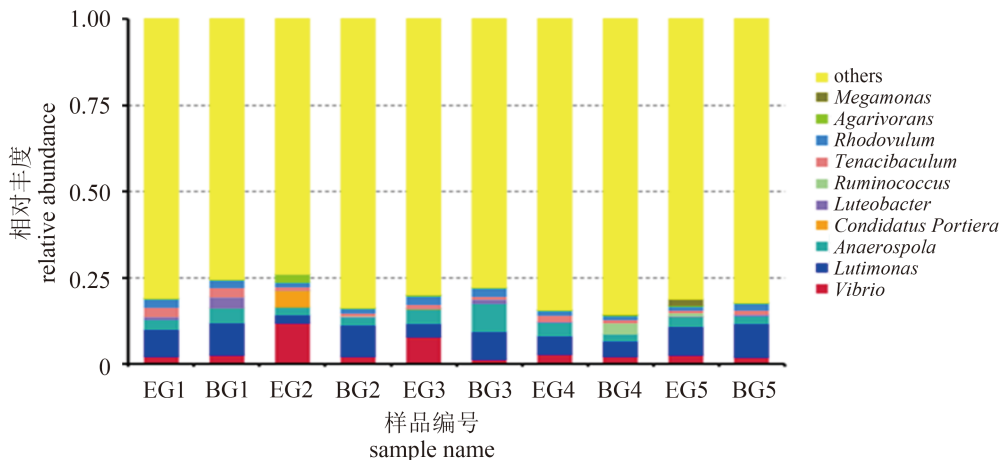


图4 以“属”为分类单元的多样本柱状图

未命名的“属”统一为others

Fig. 4 Taxon with Genus among the samples' histogram

unclassified Genus as others

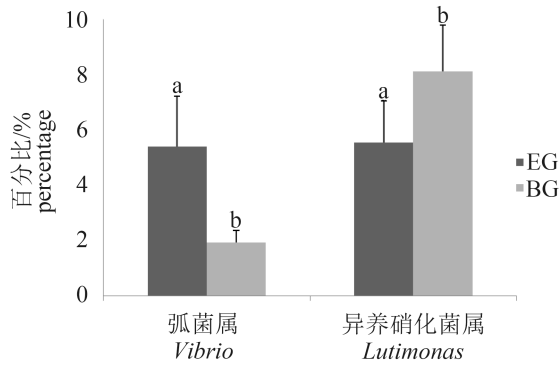


图5 弧菌属和异养硝化菌属平均占比柱状图

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 5 The average of *Vibrio* and *Lutimonas*' proportional histogram

The different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

免疫力等^[12]。兰萍等^[13]以分离于健康凡纳滨对虾肠道内的美人鱼发光杆菌(*Photobacterium*)为研究对象, 将其添加于饲料可以提高凡纳滨对虾的非特异性免疫水平和抗病力。有研究认为, 在鱼肠道内的优势菌群具有稳定肠道菌落组成, 抑制或杀死病原菌的作用^[14-15]。孙艳等^[16-17]将坚强芽孢杆菌添加于凡纳滨对虾饲料中, 凡纳滨对虾体内超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、一氧化氮合酶和溶菌酶活力显著提高, WSSV攻毒后, 实验组成活率显著高于对照组。芽孢杆菌可以进入对虾肠道内刺激对虾免疫防御系统, 与病原菌竞争营养和黏附位点, 增强对虾的非特异性免疫力^[18-20]。有研究表明向对虾养殖池塘泼洒蜡样芽孢杆菌, 可以显著降低水体中氨氮亚硝酸盐含量, 改善水体养殖环境^[21]; 蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾无节幼体Ⅲ期到蚤状幼体Ⅱ期幼体的变态具有极显著促进作用^[22]; 在对虾苗种期使用蜡样芽孢杆菌可以显著提高虾苗的成活率; 凡纳滨对虾成虾摄食蜡样芽孢杆菌后, 可以显著提高非特异性免疫效应^[23]。本实验结果表明, 投喂蜡样芽孢杆菌可以明显提高凡纳滨对虾的生长速度, 实验组比空白组生长速度快15.2%。关于对虾的成活率, 由于养殖场销售数据不是很精确, 故在此只进行估算分析: 实验组每池平均存活7200尾, 空白组存活6100尾, 实验组存活率为80.0%, 空白组存活率为67.7%, 实验组高于空白组。另外因进排水条件限制(主要是担心病原传播的风险)未进行病毒性或细菌性病原攻毒实验, 来验证外源补充蜡

样芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病原感染的影响。

肠道微生物菌群结构和功能在对虾生长中具有重要作用, 与对虾营养代谢、能量平衡、免疫防御和胃肠道发育等生理过程紧密相关, 是维持机体肠道内环境稳定的重要因素。对虾肠道菌群的研究最初是通过传统培养技术实现。传统的分类鉴定方法主要是利用选择性培养基对微生物进行纯培养, 以微生物形态特征和生理生化性状为依据进行分类鉴定。该方法具有成本低、操作简便、分离出的菌体纯度较高等特点, 但肠道微生物区系90%以上为专性厌氧菌, 由于营养成分和培养条件的限制, 肠道绝大多数细菌无法分离培养, 从而导致传统分类鉴定方法得到的对虾肠道菌群不能全面反映其菌群多样性^[24]。

近年来, 以细菌16S *rRNA*基因分析为基础的微生物分子生物学研究方法促进了对虾肠道菌群结构的研究, 有效解决了肠道大多数微生物难以分离培养的难题, 能够更加精确地研究对虾肠道微生物区系组成、功能基因挖掘、进化历程、代谢通路分析等, 王亭芳等^[25]采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对凡纳滨对虾养殖水体中的微生物多样性进行了研究分析, 基于基因组图谱的差异性和测序比对技术, 鉴定到许多传统方法所无法发现的微生物种类, 并进行了优势分析, 显示了现代分子生物学技术在探究微生物菌群组成和区系优势变化方面的强大作用。16S rDNA高通量测序技术是以环境样品微生物16S rDNA的PCR产物进行高通量测序, 并将得到的测序数据与已有的16S rDNA数据库进行比对分析, 从而对环境群落多样性进行研究, 包括微生物的种类和不同种类间的相对丰度等。目前, 该技术已经广泛应用于土壤、海洋、淡水、动物胃肠道系统等环境微生态结构的研究^[26-28]。

纵观整个养殖阶段对虾肠道微生物DNA-16S rDNA中可变区V4区的高通量测序结果, 在门水平上, 健康凡纳滨对虾肠道中含量最高的是变形菌门, 其次是拟杆菌门。属水平上则主要包含异养硝化菌属、弧菌属、*Anaerospira*、小红卵菌属等。实验组肠道内的弧菌属含量为1.94%, 明显低于空白组的5.40%, 可见在饲料中添加蜡样芽孢杆菌可以降低对虾肠道内弧菌属含量。第52天和59天, 空白组与实验组弧菌属含量差别较大, 可以推测饲料中添加蜡样芽孢杆菌在对

虾生长较快的阶段更易降低肠道内弧菌属含量。本实验在在凡纳滨对虾肠道内并未检测到蜡芽孢杆菌, 是因为含量太低还是其在肠道内不能定殖还需要做进一步研究。

4 结论

在饲料中添加芽孢杆菌可以显著提高凡纳滨对虾的生长速率。凡纳滨对虾肠道内微生物在门水平上以变形菌门、拟杆菌门为主, 厚壁菌门、疣微菌门、浮霉菌门、放线菌门含量较低; 在属水平上以异养硝化菌属、弧菌属、*Anaerospira*等为主。在饲料中添加芽孢杆菌能够促使凡纳滨对虾肠道微生物更加稳定。在饲料中添加芽孢杆菌可以显著降低凡纳滨对虾肠道内弧菌属的含量, 可以显著提高凡纳滨对虾肠道内异养硝化菌属的含量。

参考文献:

- [1] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 1999, 180(1-2): 147-165.
- [2] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 655-671.
- [3] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11)[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288.
- [4] Rengpipat S, Tunyanun A, Fast A W, *et al.* Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(2): 169-173.
- [5] Li J Q, Tan B P, Mai K S. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 291(1-2): 35-40.
- [6] 孙艳, 宋晓玲, 刘飞, 等. 一株芽孢杆菌PC024的鉴定及其抗WSSV感染效果的研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(4): 574-583.
- Sun Y, Song X L, Liu F, *et al.* Isolation and identification of *Bacillus* sp. and evaluation of its effect on WSSV disease resistance in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 574-583(in Chinese).
- [7] Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-2): 259-270.
- [8] Li K, Zheng T L, Tian Y, *et al.* Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(4): 525-530.
- [9] Ziaei-Nejad S, Rezaei M H, Takami G A, *et al.* The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 516-524.
- [10] 严雪平, 袁剑波, 刘斌. 凡纳滨对虾肠道微生物宏基因组Solexa测序及其初步分析[J]. *海洋科学*, 2012, 36(6): 9-14.
- Yan X P, Yuan J B, Liu B. Solexa sequencing and analysis of the intestinal microorganisms metagenome in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(6): 9-14(in Chinese).
- [11] 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.
- 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(in Chinese).
- [12] 刘君, 宋晓玲, 陈志鑫. 益生菌对水产动物的作用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(9): 78-81.
- Liu J, Song X L, Chen Z X. Progress on the function of probiotics in aquaculture[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, 30(9): 78-81(in Chinese).
- [13] 兰萍, 宋晓玲, 张辉, 等. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 65-73.
- Lan P, Song X L, Zhang H, *et al.* Effect of *Photobacterium damsela* on the non-specific immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 65-73(in Chinese).
- [14] van den Bogaard A E, Stobberingh E E. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and

- humans[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14(4): 327-335.
- [15] Verschuere L, Rombaut G, Huys G, *et al.* Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2527-2533.
- [16] 孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 845-851.
Sun Y, Liu F, Song X L, *et al.* Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 845-851(in Chinese).
- [17] 李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1358-1367.
Li G Y, Song X L, Sun Y, *et al.* Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1358-1367(in Chinese).
- [18] Kulik M M. The potential for using *cyanobacteria* (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1995, 101(6): 585-599.
- [19] Zhou Z G, Ding Z K, Huiyuan L V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(2): 296-301.
- [20] Harzevili A R S, Van Duffel H, Defoort T, *et al.* The influence of a selected bacterial strain *Vibrio anguillarum* TR 27 on the growth rate of rotifers in different culture conditions[J]. *Aquaculture International*, 1997, 5(2): 183-188.
- [21] Chang W T, Chen C S, Wang S L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source[J]. *Current Microbiology*, 2003, 47(2): 102-108.
- [22] 温崇庆, 薛明, 何红, 等. 蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼体变态的影响[J]. *水产科学*, 2007, 26(8): 440-444.
Wen C Q, Xue M, He H, *et al.* Effects of bacterium *Bacillus cereus* on metamorphosis of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Larvae[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(8): 440-444(in Chinese).
- [23] Nair A G H, Donio M T B S, Viji V R T, *et al.* Isolation from coconut retting effluent of *Bacillus cereus* TC-2 antagonistic to pathogenic *Vibriosis*[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(3): 631-637.
- [24] 贾慧茹, 王星, 周婷. 蜜蜂肠道微生物研究概况[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(4): 116-121.
Jia H R, Wang X, Zhou T. Introduction of intestinal tract microorganisms in honeybees[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(4): 116-121(in Chinese).
- [25] 王亭芳, 金风杰, 马士禹, 等. DGGE技术对南美白对虾养殖水体中微生物多样性的研究[J]. *生物技术通报*, 2012(10): 131-136.
Wang T F, Jin F J, Ma S Y, *et al.* Research on microbial diversity in aquicultural water of *Penaeus vannamei* with DGGE technique[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 131-136(in Chinese).
- [26] 袁东芳, 于乐军, 刘晨光. 海洋微生物高通量培养方法和分选技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(6): 1180-1187.
Yuan D F, Yu L J, Liu C G. Progress in high-throughput culturing and sorting of marine microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6): 1180-1187(in Chinese).
- [27] 徐德峰, 李彩虹, 孙力军, 等. 南美白对虾肠道微生物宏基因组提取方法的比较[J]. *生物技术通报*, 2013(12): 119-122.
Xu D F, Li C H, Sun L J, *et al.* Comparative analysis of extraction method in genome DNA from intestinal microflora of *Penaeus vannamei*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(12): 119-122(in Chinese).
- [28] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学(Metagenomics)的研究现状和发展趋势[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(2): 209-218.
He J Z, Zhang L M, Shen J P, *et al.* Advances and perspectives of Metagenomics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(2): 209-218(in Chinese).

Effects of dietary with *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*

TANG Yang^{1,2}, LIU Wenliang^{1,2}, SONG Xiaoling^{2*}, ZHANG Xiaojing^{2,3},
ZHANG Shengjing^{1,2}, HUANG Jie²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to research the effect of *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*, *Bacillus cereus* (number PC465) was added to basic feed with concentration of viable bacteria of 10^8 CFU/g. Shrimps living in 8 pools with the similar light and position were divided into two groups, and the experimental group was fed the immune feed everyday while the blank control group were fed basic feed. Shrimps were fed with a complete breeding cycle (95days) in the farm. Sampled at Day 45, 52, 59, 66, 73, the method of high throughput sequencing of 16S rDNA gene's V4 region was used to determine diversity and composition of bacterial communities in each of these samples. Experiment showed: (1) The growth rate of the experimental group was average 15.2% higher than the blank control group. (2) The intestinal microflora of *L. vannamei* contained high proportion of Proteobacteria and Bacteroidetes, while Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Actinobacteria were at lower rate. (3) In intestinal microflora of the blank control group' shrimps, the average proportion of Proteobacteria (68.30%) was higher than the experimental group (57.94%), while Bacteroidetes was lower than the control group. Proteobacteria was mainly composed of *Vibrio*, *Anaerospora* and *Rhodovulum*. The blank control group' average proportion of *Vibrio* was 5.40%, while the experimental group was 1.94%. Bacteroidete was mainly of *Lutimonas* and *Tenacibaculum*. The blank control group' average proportion of *Lutimonas* was 5.56%, while the experimental group was 8.12%. The results of the study suggest that dietary with *Bacillus cereus* can change the intestinal microflora of *L. vannamei* and enhance its growth.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Bacillus cereus*; intestinal microflora; high throughput sequencing

Corresponding author: SONG Xiaoling. E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

Funding projects: The Program of Introducing International Advanced Agricultural Science and Technology (2016-X56); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0401)