

文章编号: 1000-0615(2017)05-0785-10

DOI: 10.11964/jfc.20160210291

## 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征

薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 梁华芳, 陈第省,  
王立群, 刘杨锋, 温崇庆\*

(广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524025)

**摘要:** 为了解凡纳滨对虾育苗期正常苗池水体菌群结构和多样性变化, 实验采用 Illumina MiSeq 高通量测序水体细菌 16S rDNA V<sub>4</sub> 区, 比较幼体在无节 V 期(N5)、溞状 II 期(Z2)、糠虾 I 期(M1)与仔虾 I 期(P1)时的水体菌群特征。结果显示, 水体菌群 Shannon 多样性指数随幼体发育先降后升, 而 Pielou 均匀度指数除在 N5 时稍高外, 在其余阶段都很接近。育苗期间, 变形菌门为水体绝对优势菌群(50.0%~88.0%), 尤其红杆菌科从 N5 到 P1 阶段分别占 24.2%、61.6%、43.3% 和 51.8%; 拟杆菌门在各期丰度均 >9.7%, 其中腐螺旋菌科以 5.3%~16.9% 优势分布于后 3 个阶段; 放线菌门在后 3 个期都为优势类群, 并以微杆菌科为主, 丰度分别达 5.6%、37.6% 和 10.8%; 而疣微菌门只在 P1 时表现为优势(5.3%)。苗池水体核心菌属主要由洛克氏菌、海命菌、栖东海菌、亚硫酸杆菌和 2 个分类未定属构成。可见水体菌群呈高度多样而动态变化, 且 N5 菌群明显区别于后 3 个阶段。育苗期间水体主要环境因子总体波动较小, 对优势操作分类单元(OTU)丰度分布无显著影响。研究表明, 凡纳滨对虾健康苗池水体菌群随幼体发育和饵料投喂而明显更替, 其中核心菌群的潜在功能对维持水体生态系统稳定起重要作用, 可为对虾育苗益生菌与健康苗池指示菌的筛选提供依据。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 水体菌群; 育苗期; 细菌多样性; 高通量测序

**中图分类号:** S 968.2

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾, 简称白虾, 是目前世界范围内广泛养殖的重要虾种。对虾产业可持续发展的首要问题是优质苗种供应, 其市场需求量巨大。对虾育苗水体环境相对封闭, 育苗期间较少换水且幼体密度高, 加上饵料、残骸和排泄物积累, 容易滋生机会病原菌从而导致水体菌群失衡与水质恶化, 造成幼体特别是溞状期和糠虾期幼体大量甚至全部死亡<sup>[1-3]</sup>。高产优质的虾苗, 除了与亲本种质、饵料营养相关外, 与环境因素尤其是水体微生物群落的生态调控作用密不可分。水体菌群结构组成与多样性很大程度上影响着水质和养殖动物健康。细菌性疾病

如弧菌病与丝状细菌病常见于包括对虾在内的水产甲壳动物幼体, 其主要病原菌源自水体环境的弧菌属(*Vibrio*)、亮发菌属(*Leucothrix*)和丝硫菌属(*Thiothrix*)等<sup>[1-5]</sup>。另一方面, 正常养殖水体中也包含大量中性与有益微生物类群, 这些菌群在物质循环、疾病控制、水质调节与维持生态系统稳定方面起着至关重要的作用<sup>[6-7]</sup>。

有关对虾育苗水体中可培养微生物尤其是弧菌与苗期病害相关性早有研究<sup>[1-2]</sup>, 而从分子生态学角度开展苗池水体菌群结构变化的报道相对较少, 仅张吕平等<sup>[8]</sup>和 Wen 等<sup>[9]</sup>通过变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分别研究了链霉素对凡纳滨对虾仔虾阶段

收稿日期: 2016-02-24 修回日期: 2016-08-27

资助项目: 国家自然科学基金(31372536, 31502189); 广东省科技计划项目(2015A020209160)

通信作者: 温崇庆, E-mail: chongqingwen@163.com

和海洋蛭弧菌对凡纳滨对虾育苗早期水体菌群影响; Xue等<sup>[10]</sup>结合DGGE和分离培养方法分析了凡纳滨对虾苗池水体优势菌群变化,并分离到一些潜在益生菌。这些已有报道,主要基于常规分离培养和/或DGGE等局限性分子生态学技术,只能检测极少数易培养或优势微生物的波动情况,难以深入认识菌群结构多样性及其演替特征。最近几年高通量测序技术飞速发展,突破了这种局限。高通量测序能更灵敏地探测包括稀有微生物在内的环境微生物多样性,可实现宏基因组水平上多重样品间的平行比较研究,极大拓展了微生物生态学研究广度和深度<sup>[11]</sup>。

对虾育苗期间,幼体频繁变态、饵料类型多次转换以及水体环境因子波动,这些因素是否会引起水体菌群结构的显著变化,继而反馈作用于水体和幼体,目前对这种菌群结构演替尚缺乏深入认识。本实验通过高通量测序对凡纳滨对虾幼体关键时期的苗池水体菌群变化进行分析,以了解其菌群结构变化特征及其潜在益生菌,为对虾微生态育苗和苗期病害防控等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 育苗条件和水样采集

2014年1月从广东湛江永联对虾育苗场选择一个室内育苗池(5.0 m×4.0 m×1.6 m),水体20 m<sup>3</sup>。育苗用海水经砂滤和滤网(1~5 μm)过滤沉淀后按每立方水体加入20 mL甲醛消毒,曝气1 d后,投放无特定病原的凡纳滨对虾无节Ⅲ期(N3)幼体,幼体初始密度200只/L。育苗期间水体持续通气,当幼体发育到无节Ⅵ期(N6)时,投喂螺旋藻粉和虾片;蚤状Ⅱ期(Z2)后阶段,停用螺旋藻粉,改投卤虫无节幼体;糠虾Ⅱ期(M2)时继续投喂卤虫和虾片的同时加投入工饵料BP粉(富含蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等)。育苗期间,未使用抗生素和其他化学药物,幼体健康,无发病现象,仔虾Ⅴ期(P5)时出苗率为75%。

分别在投放幼体后12 h、2 d、4 d、8 d,即90%以上的幼体发育至无节Ⅴ期(N5)、Z2、糠虾Ⅰ期(M1)和仔虾Ⅰ期(P1)时采集水样,以N5、Z2、M1和P1代表各期样品编号。每次从苗池4个位点共采集6 L水样装入无菌聚乙烯袋,1 h内运回实验室用纱绢网滤去幼体,再取1 L水样经0.22 μm

滤膜过滤,所得滤膜暂存于-20 °C供DNA提取。

### 1.2 主要环境因子监测

苗池水温、盐度和pH值等在采样时直接用温度计、盐度计和pH计测定,以4个位点的平均值表示。化学需氧量(COD)、氨氮(NH<sub>3</sub>-N)和亚硝酸氮(NO<sub>2</sub>-N)含量按《海洋监测规范》第4部分:海水分析(GB 17378.4-2007)<sup>[12]</sup>方法测定,对每一幼体期采集的水样做3次重复测定,取平均值表示。

### 1.3 水样基因组DNA提取和PCR扩增

采用OMEGA公司Water DNA Kit (D5525-01)按其操作说明提取滤膜上的水样总DNA,每个样品做两次重复提取,再将两次洗脱DNA混合在一起。以PicoGreen法对所提DNA定量<sup>[13]</sup>,再将各样品DNA稀释至2 ng/μL作为模板DNA。以细菌16S rDNA V4区引物扩增各样品模板DNA,扩增用V4区通用引物515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')上加有接头和测序引物序列,在测序引物序列后接有0~7个碱基的spacer序列用以提高扩增测序效率,同时反向引物上另接有12个不同碱基的标签序列<sup>[11]</sup>。每一样品做3次重复扩增,PCR反应体系和扩增条件按温崇庆等<sup>[14]</sup>方法进行。将3个重复PCR的阳性扩增产物混合为一个样品,再以PicoGreen法定量PCR产物。

### 1.4 高通量测序和数据分析

将本研究各样品和其他样品PCR产物以等摩尔量混合后通过Qiagen公司QIAquick Gel Extraction Kit (28704)切胶回收目的片段,进一步PicoGreen定量后,在美国俄克拉荷马大学环境基因组研究所利用Illumina MiSeq测序平台采用MiSeq Reagent Kit v2(500-cycle)完成测序。

参考温崇庆等<sup>[14]</sup>方法对测序原始数据进行处理,最后由UPARSE程序在97%相似性水平上生成去除singleton的OTU (operational taxonomic unit)及相应序列文件。通过RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)对各OTU代表序列进行分类,通过EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/identify>)和/或NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast程序进一步修正分类单元,并剔除个别非细菌OTU。通过R语言包对OTU表再抽样(resampling),使各样品获得一致序

列数, 做出基于OTU的稀释曲线, 计算Shannon多样性指数。OTU覆盖度(coverage,  $C$ )按公式  $C=1-n_1/N$  计算, 其中  $N$  代表某样品获得的有效序列数,  $n_1$  表示在该样品中仅有一条序列的OTU数。

通过Excel统计各样品在门、纲、目、科、属和OTU水平上的分类单元数, 并对占任一样品序列丰度  $\geq 5.0\%$  的优势门、科和属进行比较分析。通过R语言包对序列丰度  $\geq 1.0\%$  的OTU组成情况作热图分析, 并对相关OTU与环境因子进行典范对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)。

## 2 结果

### 2.1 苗池主要环境因子变化

采样时所监测的苗池水体主要环境因子如表1所示。实验期间, 苗池水温比较稳定; pH值缓慢降低; 盐度在N5到M1时维持稳定, P1时略有下降; COD在投放饵料前的N5时比较低, 其后明显上升并维持相对稳定; 水体 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量随幼体发育逐渐升高, 但都维持在较低水平。

### 2.2 苗池水体菌群多样性

对MiSeq测序原始数据处理后, 4个幼体期水样共获得173 746条高质量序列。通过UPARSE程序生成去除singleton的OTU表, 在97%相似性

水平上共获得270个OTU, 总计147 147条序列。对OTU序列分析显示, 它们主要属于细菌域已知的10个门, 16个纲, 38个目, 70个科和105个属; 还有②相当一部分OTU在属(119个)、科(87个)、目(63个)、纲(27个)甚至门(22个)水平上属于分类未定(unclassified)序列; 此外, 另有9个OTU属于非细菌序列。删除非细菌OTU后, N5、Z2、M1与P1样品得到的序列数分别为35 122、41 680、29 842和40 340条。

对各样品序列数再抽样, 使每个样品获得一致序列数(29 842), 同样测序深度下各样品都获得约99.9%的高覆盖度(表2), OTU稀释曲线趋于饱和(图1)。从N5到P1, 水样OTU数呈先降再升趋势, 这与Shannon多样性指数变化趋势一致, 而Pielou均匀度指数除在N5稍高外, 其余3个期都很接近(表2)。可见苗池水体菌群多样性高且呈动态变化, 尤其在初始投饵前后(N5到Z2), 以及投放BP粉前后的M1到P1期间。

### 2.3 苗池水体菌群结构组成变化

4个幼体阶段水体菌群优势门丰度发生了明显变化(图2)。其中序列丰度  $\geq 5.0\%$  的优势门包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。变形菌门占绝对优势(50.0%~88.0%), 并以 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和 $\gamma$ -

表1 育苗水体主要环境因子

Tab. 1 Main environmental factors of larval rearing water

幼体期 larval phase	温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	盐度 salinity	pH	化学需氧量/(mg/L) COD	氨氮/(mg/L) $\text{NH}_3\text{-N}$	亚硝酸氮/(mg/L) $\text{NO}_2\text{-N}$
N5	30.5	30.71	8.09	1.37	0.12	0.010
Z2	31.6	30.82	8.02	5.35	0.36	0.014
M1	31.7	30.65	7.83	7.55	0.65	0.015
P1	31.5	28.50	7.75	6.19	0.79	0.020

表2 育苗水体菌群多样性

Tab. 2 Bacterial diversity in larval rearing water

水样 water sample	操作分类单元 OTU			
	数量 number	覆盖度/% coverage	香农多样性指数 Shannon diversity index	Pielou均匀度指数 Pielou evenness index
N5	152	99.93	2.87	0.57
Z2	138	99.88	2.51	0.51
M1	134	99.89	2.44	0.50
P1	161	99.91	2.60	0.51

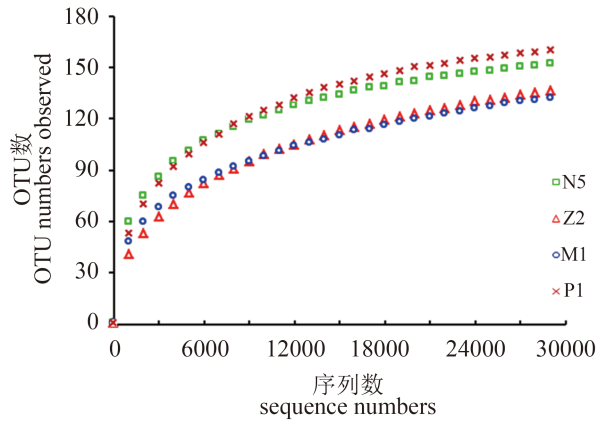


图1 育苗水体菌群OTU稀释曲线

N5、Z2、M1、P1分别表示无节幼体V期，蚤状幼体II期，糠虾幼体I期与仔虾I期水样。以下图同

Fig. 1 Rarefaction curves for the OTU numbers of microbiota in larval rearing water

N5, Z2, M1, P1 denote the water samples taken at the larval stages of nauplius V, zoea II, mysis I, and postlarvae I, respectively. The same below

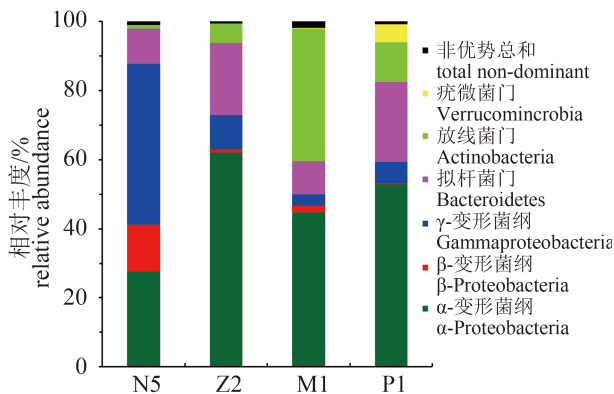


图2 育苗水体菌群优势门相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of dominant bacterial phyla in larval rearing water

变形菌纲(Gammaproteobacteria)为主, 两者在N5、Z2、M1、P1的丰度分别达27.5%、62.1%、44.8%、52.8%与46.6%、10.2%、3.3%、6.2%。此外,  $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)在N5呈13.6%的高丰度, 但在其后3个期都为非优势。拟杆菌门在各阶段丰度均高于9.7%。放线菌门除在N5丰度(0.9%)较低外, 在后3个阶段均为优势门, 尤其是M1丰度高达38.3%。疣微菌门仅在P1以5.3%的丰度优势存在, 而在其他3个期丰度都小于0.3%。此外, 除丰度极低(0%~0.3%)的6个非优势已知门外, 尚有0.1%~1.5%的序列在门水平上为Unclassified。以上表明, 不同幼体阶段苗

池菌群主要优势门类较一致, 但其相对丰度在不同阶段有着较大差异。

共有7个科在某一或多个幼体期为优势类群(丰度 $\geq 5.0\%$ ), 其中红杆菌科(Rhodobacteraceae)以绝对优势出现在Z2、M1和P1, 也是N5阶段的第2优势科(图3)。放线菌门的微杆菌科(Microbacteriaceae)和拟杆菌门的腐螺旋菌科(Saprospiraceae)除在N5丰度较低外, 在其他3个期都优势存在, 且分别是M1和P1的第2优势科。食烷菌科(Alcanivoracaceae)和嗜甲基菌科(Methylophilaceae)分别是N5最优势和第3优势科, 而在其后3个期丰度都迅速衰减。黄杆菌科(Flavobacteriaceae)是Z2的第2优势科, 在其他3个期也以一定比例出现。Roseibacillus\_f科只在P1时以5.3%丰度优势存在, 在其他3个期丰度都不到0.1%。以上结果表明, 在科水平上不同苗期优势菌群组成差异明显, 但也共享一些优势科。

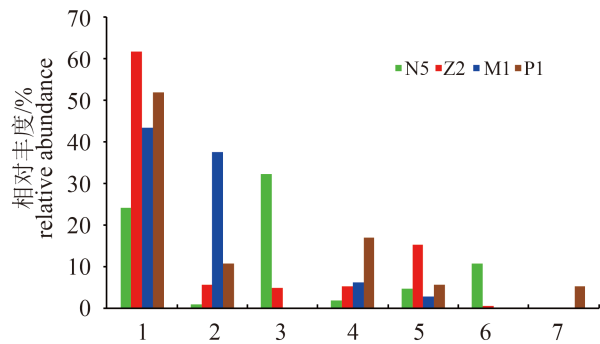


图3 育苗水体优势细菌科相对丰度

1. 红杆菌科; 2. 微杆菌科; 3. 食烷菌科; 4. 腐螺旋菌科; 5. 黄杆菌科; 6. 嗜甲基菌科; 7. Roseibacillus\_f科

Fig. 3 Relative abundance of dominant bacterial families in larval rearing water

1. Rhodobacteraceae; 2. Microbacteriaceae; 3. Alcanivoracaceae; 4. Saprospiraceae; 5. Flavobacteriaceae; 6. Methylophilaceae; 7. Roseibacillus\_f

整个育苗期水体菌群在属水平上表现为优势的有12个, 其中5个为Unclassified属(图4)。不同阶段最优势和次优势属均不同, N5、Z2、M1和P1最优势属分别为食烷菌属(*Alcanivorax*)、红杆菌科分类未定属(OTU3构成)、微杆菌科分类未定属(OTU2构成)和海命菌属(*Marivita*), 丰度均占相应样品30%以上; 次优势属分别是嗜甲基菌属(*Methylotenera*)、洛克氏菌属(*Loktanella*)、红杆菌科分类未定属(*Helicobasidium*), 丰度都超过10%。亚硫酸杆菌属(*Sulfitobacter*)和栖东海菌

属(*Donghicola*)等其余5个属都只在某一个期表现为优势。可见, 属水平上不同苗期优势菌群组成差异更显著。以丰度在后3个幼体期都超过1%的属作为苗期水体核心菌群, 本研究核心菌群包括*Loktanella*、*Marivita*、*Donghicola*、*Sulfitobacter*、*Unclassified-OTU2*和*Unclassified-OTU3*。

## 2.4 水体菌群优势OTU聚类分析

基于育苗水体OTU的聚类分析热图显示, 序列丰度 $\geq 1.0\%$ 的OTU有32个, 另有一个序列丰度较低但唯一属于弧菌科(*Vibrionaceae*)的OTU(OTU38)(图5)。这33个OTU总丰度在各期水样中都超过90%, 其序列在GenBank收录号为KU

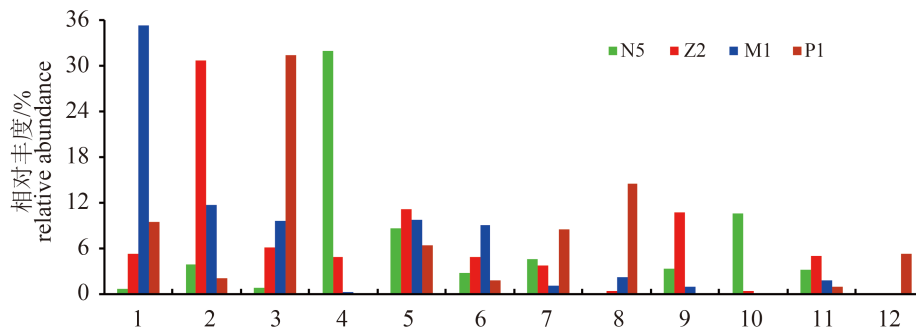


图4 育苗水体优势细菌属相对丰度

1. 微杆菌科分类未定属(OTU2); 2. 红杆菌科分类未定属1(OTU3); 3. 海命菌属; 4. 食烷菌属; 5. 洛克氏菌属; 6. 亚硫酸杆菌属; 7. 栖东海菌属; 8. *Helicobasidium*; 9. 黄杆菌科分类未定属(OTU7); 10. 嗜甲基菌属; 11. 红杆菌科分类未定属2(OTU227); 12. *Roseibacillus\_f*科分类未定属(OTU10)

Fig. 4 Relative abundance of dominant bacterial genera in larval rearing water

1. Unclassified Genus of Microbacteriaceae (OTU2); 2. Unclassified Genus 1 of Rhodobacteraceae (OTU3); 3. *Marivita*; 4. *Alcanivorax*; 5. *Loktanella*; 6. *Sulfitobacter*; 7. *Donghicola*; 8. *Helicobasidium*; 9. Unclassified Genus of Flavobacteriaceae (OTU7); 10. *Methylotenera*; 11. Unclassified Genus 2 of Rhodobacteraceae (OTU227); 12. Unclassified Genus of Roseibacillus\_f (OTU10)

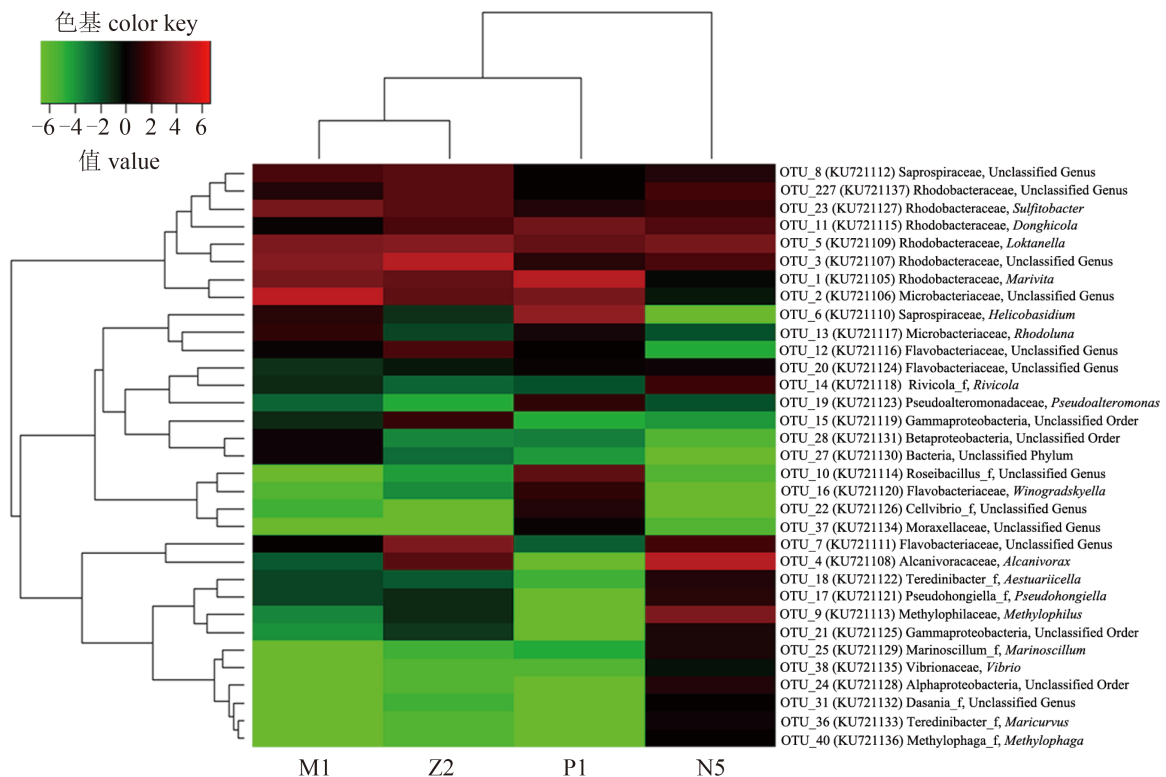


图5 苗池水体优势OTU聚类分析热图

Fig. 5 Cluster analysis of the bacterial community in larval rearing water at dominant OTU level by heatmap

721105-KU721137。从图中可见，横向样品间聚为两大类，其中N5独自为一类，而Z2与M1先归并，再与P1聚合为另一类，这表明N5水体菌群结构与其后3个期的差异较大，Z2与M1组成最相近。纵向OTU间也聚为两大分支，其中所有属于红杆菌科的6个优势OTU (OTU1、OTU3、OTU5、OTU11、OTU23、OTU227)与分别属于微杆菌科和腐螺旋菌科的OTU2和OTU8共同构成一个独立分支，总体上它们在幼体各阶段都以相对较高丰度持续存在。其余25个OTU组成另一大分支，其丰度在不同幼体期呈明显变化，如其中由OTU24、OTU25、OTU31、OTU36、OTU38和OTU40组成的一个小分支，在N5时均以较高丰度存在，而在后3个阶段极少出现甚至未能检测出。

### 2.5 优势OTU与环境因子的典范对应分析

对优势OTU丰度与育苗期3个较明显变化的环境因子(盐度、COD与NH<sub>3</sub>-N)进行典范对应分析发现，盐度与OTU227、OTU5和OTU7等明显相关联，COD与OTU13和OTU2等相关性较强，而NH<sub>3</sub>-N与OTU13等较相关(图6)。对CCA结果进行蒙特卡罗置换检验(Monte Carlo permutation test)，即用permutest函数分析3种环境因子对各期水体OTU丰度的影响，NH<sub>3</sub>-N、COD与盐度对

OTU丰度影响的决定系数( $r^2$ )分别为0.9720、0.9723与0.9746，表明这3个因子对优势OTU丰度分布均无显著影响( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 育苗水体菌群结构变化

育苗成败决定着对虾产业可持续发展与否，健康稳定的苗池生态系统才可能有高的出苗率。本实验凡纳滨对虾育苗池P5时出苗率达75%，且整个育苗期无任何可见病症出现，高通量测序分析显示育苗各阶段水体菌群均呈现较高多样性，表明菌群多样性在维持水体生态系统平衡稳定中可能起重要作用。幼体N5时水体菌群多样性与均匀度指数均高于其他各期，在不同层次分类单元的优势类群与丰度上也明显区别于后续3个阶段。N5时饵料尚未投放，幼体代谢和排泄也极少，水体菌源是消毒处理后的残存菌和最初投放N3幼体时所引入菌群，它们经过12 h的选择和适应而形成N5菌群特征。N6时螺旋藻粉和虾片的投喂以及Z2时投喂卤虫不仅直接影响水体营养成份，幼体摄食后排泄和代谢以及部分死亡幼体的分解进一步引起水体环境改变，从而引起Z2菌群结构发生明显转变。苗期后3个阶段，Z2与M1时因食物类型相近以及环境因子较少波动，菌群结构特征更相似，P1时因从M2开始饵料类型再次变动与投喂量增加，其菌群结构与Z2和M1有较明显差异，可见水体菌群随幼体发育与饵料投喂而呈明显变化。

### 3.2 水体菌群优势门与科的潜在功能

本实验N5水体菌群主要以变形菌门中的 $\alpha$ -、 $\beta$ -与 $\gamma$ -变形菌纲和拟杆菌门为主。Z2开始 $\beta$ -变形菌纲丰度迅速下降并维持较低水平，而放线菌门显著上升，与 $\alpha$ -、 $\gamma$ -变形菌纲和拟杆菌门一同组成水体中持续存在的优势类群。这与Xue等<sup>[10]</sup>通过DGGE研究另一苗场正常苗池优势菌群特征相似，该苗池菌群也以 $\alpha$ -与 $\gamma$ -变形菌纲、拟杆菌门和放线菌门为主。本实验各阶段水体中，拟杆菌类均以>9.7%的高丰度存在，尤其在Z2(20.9%)与P1(23.3%)时明显增加，这可能与多数拟杆菌具有降解不同生物高分子如纤维素、几丁质与果胶质的能力密切相关<sup>[15]</sup>。放线菌类除在N5时丰度(0.96%)较低外，随幼体发育迅速增加，尤

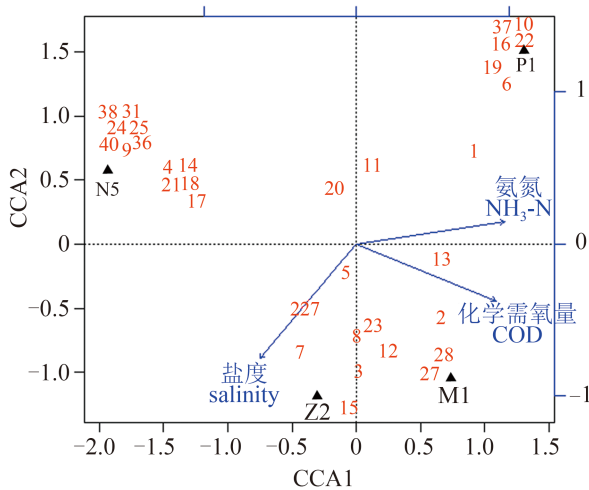


图6 育苗水体优势OTU与环境因子的典范对应分析  
图中红色数字表示优势OTU编号，黑色三角形指示幼体期的位置

Fig. 6 Canonical correspondence analysis of the dominant OTUs and environmental factors in larval rearing water

The arabic numerals in red denote OTUs ID, black triangles indicate locations of the larval stages in the figure

其在M1时高达38.3%。鉴于放线菌可作为水产益生菌的重要来源<sup>[16]</sup>,因此高丰度的放线菌表明其中某些种类对幼体有益生功效或对水质起调节作用。总体上,变形菌相对丰度随幼体发育有所下降,而放线菌与拟杆菌两者丰度之和则呈上升趋势。这种变化很可能与水体营养状态及幼体生理代谢相关,N6前因未投饵且幼体极少排泄,水体有机物含量少,从N6开始的持续投喂使水体营养化程度逐渐上升,有助于放线菌的增殖;同时幼体摄食后经肠道选择和富集,拟杆菌类容易成为幼体肠道优势菌,进而影响水体菌群。

科水平上,水体菌群最优势的为红杆菌科。该科包括多个在代谢、生理与系统发生方面高度异质的分支类群,多数是需盐种类,在元素碳和硫循环中起重要作用,也能产生多种次生代谢活性物质<sup>[17]</sup>。其中玫瑰杆菌分支(*Roseobacter* group)普遍存在海水环境,是红杆菌科类型最多的分支<sup>[17-18]</sup>。后3个幼体期水体丰度均 $\geq 1.0\%$ 的6属中有4个已知属(*Marivita*、*Loktanella*、*Sulfitobacter*、*Donghicola*)和一个Unclassified-OTU3都属于该分支,其丰度之和在Z2、M1与P1期分别高达56.6%、41.3%与50.1%,表明玫瑰杆菌分支在苗池水体中呈显著优势。其中*Sulfitobacter*是专性好氧异养型,能够氧化单质硫、亚硫酸盐与硫代硫酸盐等,参与海水硫素循环,还能降解多种酯类化合物<sup>[17]</sup>。*Loktanella*与*Marivita*都是海水中常见类群,适度嗜盐或耐盐,大多化能异养<sup>[17]</sup>,尚未见其对水产动物有致病或益生作用的报道。关于*Donghicola*及其属内种的相关功能报道还鲜见,但Xue等<sup>[10]</sup>通过DGGE研究发现,*Donghicola* sp.在其他凡纳滨对虾正常苗池中也具有优势。鉴于玫瑰杆菌分支类群高丰度存在于健康对虾苗池环境,很可能在对虾正常育苗过程中发挥关键作用,相关的优势属或种对苗池水体和幼体的生态功能值得进一步探索。

除红杆菌科外,腐螺旋菌科(*Saprospiraceae*)与黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)也是相对优势科,尤其是黄杆菌科也优势出现于其他苗池水体<sup>[10]</sup>。这两个科都属于拟杆菌门,均为海水中高丰度类群<sup>[19-20]</sup>。多数种类能水解碳聚合物与蛋白质等有机物,产生多种胞外酶以分解或利用复杂碳源<sup>[19-20]</sup>,这些特性与拟杆菌门其他类群在

海水生境的功能相近<sup>[15]</sup>,且水解产生的简单碳基质为这些菌移去水体中过量氮和磷提供了碳源<sup>[21]</sup>。因此这两个优势科对维持育苗水体生态系统平衡可能具有重要作用。另外微杆菌科是高G+C含量的放线菌<sup>[22]</sup>,除在N5丰度较低外(0.87%),在Z2、M1与P1的丰度分别达5.6%、37.6%与10.8%。微杆菌科主要为陆生,近年也常有报道分离于海水环境,可高效利用低浓度有机碳,其在育苗水体中高丰度持续存在的驱动力及其生态意义尚待研究。

此外,还有两个科均在N5时优势存在,其后迅速衰减,到P1时甚至未能检测出。其中属于 $\beta$ -变形菌纲的嗜甲基菌科完全由单一OTU9构成,OTU9序列上属于嗜甲基菌属(*Methylophilus*),该属多为专性或兼性甲基营养型,能够以甲醇、甲基胺或二氯甲烷作为唯一碳源和能源生长,可降解多种高毒性化合物如甲醇和甲醛等<sup>[23]</sup>,可见该科极可能是最初用甲醛处理水体后富集选择的过路菌,但随着水体甲醛降解和环境改变而迅速衰亡。另一个是属于 $\gamma$ -变形菌纲的食烷菌科,是N5时丰度最高的科(31.9%),也是由单一的OTU4构成,分类上OTU4序列属于食烷菌属。食烷菌能在以石油及其衍生物为主要碳源的环境中生长<sup>[24]</sup>,有研究表明该属很可能也是甲基营养型<sup>[25]</sup>,因此可与嗜甲基菌属一样利用水体残留甲醛为营养进行生长并只在育苗早期表现优势,它们对消除苗池残留甲醛应该发挥了重要作用。

### 3.3 水体核心菌群的指示作用

目前益生菌已在对虾育苗中较广泛使用,其菌种多为非土著来源菌,特别是陆源的芽孢杆菌和光合细菌等应用较多<sup>[26]</sup>,但这些益生菌在育苗水体中难以稳定存在和持续作用。鉴于水体菌群组成和丰度与育苗系统稳定性密切相关,了解对虾育苗环境中菌群结构及其演替特征,不仅有助于开发利用其中的土著有益菌进行微生态育苗,对育苗期与后续养成期的病害发生也可起到早期预警作用。如Sakami等<sup>[27]</sup>报道褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)正常生长状态时的水体菌群结构明显不同于生长受抑制时菌群,其中鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、海单胞菌属(*Marinomonas*)与小海员菌属(*Nautella*)的出现可表明轮虫生长处于良好状态。Xiong等<sup>[28]</sup>报道凡纳

滨对虾养成期间疾病暴发与浮游细菌群落结构的骤变密切相关, 并发现13个科可作为预测病害出现与否的细菌指示型。本研究育苗期间弧菌科在水体均为非优势出现, 唯一属于该科的OTU38 (*Vibrio* sp.) 仅在N5时以0.8%丰度存在, 在后3个期丰度极低( $\leq 0.01\%$ ), 水体中也始终未检测到亮发菌属和丝硫菌属相关序列。这些对虾苗池中常见的潜在病原菌极少或者未被检测到, 间接表明该苗池生态系统处于健康状态。作为本实验苗池的核心菌群, 即持续存在于后3个阶段的6个优势属(*Marivita*、*Loktanella*、*Sulfitobacte*、*Donghicola*、Unclassified-OTU2和Unclassified-OTU3)可能在幼体发育和维持苗池生态系统稳定中起重要作用, 是否可作为对虾育苗用益生菌和健康苗池的指示菌, 需要今后在更广泛采样基础上结合分离培养和育苗实验予以验证。

感谢美国俄克拉荷马大学环境基因组研究所周集中教授为本研究提供的技术平台。

#### 参考文献:

- [1] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠, 等. 对虾育苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 1999.  
Xu H S, Yang X S, Li Y, *et al.* Diagnosis and control of bacterial diseases in Penaeid shrimp hatcheries[M]. Beijing: Ocean Press, 1999 (in Chinese).
- [2] Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, *et al.* Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2592-2597.
- [3] FAO. Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America[R]. FAO Fisheries Technical Paper No. 450. Rome. 2003,
- [4] 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.
- [5] Soto-Rodríguez S A, Simoes N, Roque A, *et al.* Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios[J]. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 109-115.
- [6] Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, *et al.* Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(6): 1935-1946.
- [7] Blancheton J P, Attramadal K J K, Michaud L, *et al.* Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication[J]. Aquacultural Engineering, 2013, 53: 30-39.
- [8] 张吕平, 胡超群, 罗鹏, 等. 抗生素对于对虾苗池水体细菌区系的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(10): 2551-2557.  
Zhang L P, Hu C Q, Luo P, *et al.* Effects of antibiotics on bacterial community in shrimp hatchery system[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(10): 2551-2557(in Chinese).
- [9] Wen C Q, Xue M, Liang H F, *et al.* Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 173(1-2): 84-91.
- [10] Xue M, Liang H F, He Y Y, *et al.* Characterization and in-vivo evaluation of potential probiotics of the bacterial flora within the water column of a healthy shrimp larviculture system[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(3): 484-491.
- [11] Wu L Y, Wen C Q, Qin Y J, *et al.* Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 125.
- [12] 中华人民共和国国家标准海洋监测规范第4部分: 海水分析(GB17378.4-2007)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.  
State Bureau of Quality and Technical Supervision of China. The specification for marine monitoring Part 4: seawater analysis (GB 17378.4-2007)[S]. Beijing: China Standards Press, 2007 (in Chinese).
- [13] Ahn S J, Costa J, Emanuel J R. PicoGreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(13): 2623-2625.
- [14] 温崇庆, 何瑶瑶, 薛明, 等. 高通量测序分析DNA提取引起的对虾肠道菌群结构偏差[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 130-142.



- Wen C Q, He YY, Xue M, *et al.* Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 130-142(in Chinese).
- [15] Kirchman D L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(2): 91-100.
- [16] Das S, Ward L R, Burke C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 419-429.
- [17] Pujalte M J, Lucena T, Ruvira M A, *et al.* The Family Rhodobacteraceae[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (Eds.) *The Prokaryotes* (4th edition), Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Berlin: Springer, 2014: 439-512.
- [18] Lenk S, Moraru C, Hahnke S, *et al.* Roseobacter clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(12): 2178-2187.
- [19] McIlroy S J, Nielsen P H. The Family Saprospiraceae[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (Eds.) *The Prokaryotes* (4th edition), Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. Berlin: Springer, 2014: 863-889.
- [20] McBride M J. The Family Flavobacteriaceae[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, Eds. *The prokaryotes* (4th edition), other major lineages of *Bacteria* and the Archaea. Berlin: Springer, 2014: 643-676.
- [21] Nielsen P H, Mielczarek A T, Kragelund C, *et al.* A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 5070-5088.
- [22] Stackebrandt E, Brambilla E, Richert K. Gene sequence phylogenies of the family Microbacteriaceae[J]. *Current Microbiology*, 2007, 55(1): 42-46.
- [23] Trotsenko Y A, Doronina N V, Khmelenina V N. Biotechnological potential of aerobic methylotrophic bacteria: a review of current state and future prospects[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2005, 41(5): 433-441.
- [24] Kostka J E, Prakash O, Overholt W A, *et al.* Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 7962-7974.
- [25] Tavormina P L, Ussler III W, Orphan V J. Planktonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep systems along the north American margin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(13): 3985-3995.
- [26] Xue M, Wen C Q, Liang H F, *et al.* *In vivo* evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(5): 1661-1669.
- [27] Sakami T, Koiso M, Sugaya T. Characterization of bacterial community composition in rotifer cultures under unexpected growth suppression[J]. *Fish Science*, 2014, 80(4): 757-765.
- [28] Xiong J B, Zhu J L, Zhang D M. The application of bacterial indicator phylotypes to predict shrimp health status[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(19): 8291-8299.

## Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing

XUE Ming, HE Yaoyao, QIU Mengde, LIANG Huafang, CHEN Disheng,  
WANG Liquan, LIU Yangfeng, WEN Chongqing\*

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** In order to characterize the bacterial community structure and diversity in rearing water of healthy *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period, the genomic DNA of aquatic microbiota from larval stages of nauplius 5 (N5), zoea 2 (Z2), mysis 1 (M1) and postlarvae 1 (P1) was amplified with 16S rDNA V4 primers and sequenced by a high-throughput Illumina MiSeq platform. The results showed that the bacterial Shannon diversity index increased at P1 stage after declining gradually from stages N5 to M1, the Pielou evenness index at N5 stage was a little higher than those of the following three stages, which were approximated closely. During the entire larviculture period, the phylum Proteobacteria was overwhelmingly dominated in rearing water with high abundance up to 50.0%–88.0%, especially, the family Rhodobacteraceae of which had high abundances of 24.2%, 61.6%, 43.3%, and 51.8% at stages N5, Z2, M1, and P1, respectively. Bacteroidetes thrived in various stages with abundance higher than 9.7%, and the family Saprospiraceae of this phylum existed significantly (5.3%–16.9%) in the latter three phases. Actinobacteria presented also dominantly in rearing water except for the N5 stage, and the family Microbacteriaceae with abundances of 5.6%, 37.6% and 10.8% for Z2, M1, and P1 stages, respectively. The phylum Verrucomicrobia dominated only at P1 stage (5.3%). In the larviculture water, the core microbiota at genus level consisted of *Loktanella*, *Marivita*, *Donghicola*, *Sulfitobacter*, and two unclassified candidates. Thus the microbiota in larval rearing water harbored a high diversity and presented dynamic succession, which differed obviously between N5 stage and the latter three stages. Overall, the main environmental factors in larviculture water varied slightly and exhibited no significant effect on abundance of dominant OTUs (operational taxonomic units). In conclusion, the bacterial community in rearing water of healthy *L. vannamei* larvae shifts in composition and abundance with larval development and diet feeding. And the core microbiota with potential functions play an important role in maintaining homeostasis in the larviculture system, which could serve as candidates for autochthonous probiotics, as well as healthy indicator for shrimp larviculture.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; aquatic microbiota; hatchery phase; bacterial diversity; high-throughput sequencing

**Corresponding author:** WEN Chongqing. E-mail: chongqingwen@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31372536, 31502189); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2015A020209160)