

文章编号: 1000-0615(2018)03-0399-11

DOI: 10.11964/jfc.20170310737

## 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究

郁维娜<sup>1,2</sup>, 戴文芳<sup>1,2</sup>, 陶震<sup>1,2</sup>, 熊金波<sup>1,2\*</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;

2. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为探究病害发生后健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构和功能的差异, 并筛选肠道指示菌群来评估宿主健康状况, 评价凡纳滨对虾肠道菌落的功能冗余性。实验采集健康和患病凡纳滨对虾样品, 通过Illumina高通量测序技术测定肠道菌群组成, 并利用PICRUSt进行功能预测, 以此比较健康与患病凡纳滨对虾肠道微生物的群落结构和功能差异, 并预测功能与群落组成的相关性。结果显示, 病害的发生伴随着肠道菌群结构的显著变化, 而多样性无显著差异。与健康凡纳滨对虾肠道细菌组成相比, 患病凡纳滨对虾肠道中放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)相对丰度降低, 而 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)增加。同时, 筛选出16个指示细菌科, 能够很好地指示宿主健康状况。与健康组相比, 患病凡纳滨对虾中参与弧菌侵染的过程显著增加, 而溶酶体和过氧化物酶等免疫功能代谢过程显著减弱。此外, 肠道微生物群落结构与功能组成呈显著正相关, 表明凡纳滨对虾肠道菌群组成具有较低的功能冗余性。研究表明, 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构存在显著差异, 并且由细菌介导的功能随之发生改变, 能够用指示微生物评估宿主健康状况。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 肠道菌群; 功能组成; 指示细菌科; 功能冗余

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

肠道是最重要的消化吸收器官, 寄居着大量群体结构复杂的微生物。在长期进化过程中, 肠道微生物与宿主形成相互依赖、相互制约的关系。肠道微生物在维持宿主健康中发挥重要作用, 有研究表明, 不同结构和组成的肠道微生物群落能够影响宿主的营养代谢和对外源病原菌侵染的敏感性<sup>[1-2]</sup>。病原微生物的侵染能够改变肠道微生物群落组成, 进而破坏肠道微生物的正常功能, 导致疾病产生。近年来, 大量研究表明, 病害的发生是由多种病原菌协同作用造成的。然而, 过去主要通过从病害个体中分离潜在的单一或少数病原菌, 而缺乏从群落水平进行肠道微生物组成的研究。因此, 对于能否利用肠道菌群的变化来评估水产养殖生物的健康状况尚不明确。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是重要的水产养殖品种, 在全球范围内具有很高的经济价值。然而, 近年来由于向高密度、集约化的养殖方式发展, 导致对虾养殖疾病暴发越来越频繁<sup>[3-4]</sup>。对虾特异性免疫系统的缺失使其只能通过非特异性免疫的方法去识别异己, 抵御各种病原体感染以及减少环境胁迫对自身造成的影响<sup>[5]</sup>, 因此在低等生物中, 如对虾, 肠道菌群的正常结构和功能显得更为重要。近年来有研究发现, 疾病发生后对虾肠道微生物的群落组成发生显著变化, 多样性降低<sup>[6]</sup>, 并建立了养殖环境因子和肠道菌群间的关系<sup>[7]</sup>。这些研究证实了肠道微生物在维持对虾健康方面起到重要作用, 并初步明确了引起病害的环境因子, 为对虾养殖的日常管理提供了科学依据。然而, 现

收稿日期: 2017-03-05 修回日期: 2017-04-25

资助项目: 浙江省应用公益性项目(2016C32063); 宁波市科技惠民项目(2017C10044)

通信作者: 熊金波, E-mail: xiongjinbo@nbu.edu.cn

有研究主要集中在病害发生与肠道微生物群落组成的相关性,而缺乏群落变化如何影响微生物介导的功能信息。由于微生物群落具有较高的功能冗余性,我们对于肠道菌群的变化在多大程度上影响其功能尚不明确,究其原因,可能是由于宏基因组测序成本较高,缺乏对应的数据库进行功能比对。近年来,由于生物信息学的快速发展,能够利用细菌组成预测对应的功能。Loudon等<sup>[8]</sup>利用PICRUSt<sup>[9]</sup>对红背蝾螈(*Plethodon cinereus*)皮肤上的核心细菌群落进行功能预测,发现核心细菌与免疫调节紧密联系,在维持机体基本功能中发挥重要作用。Mchardy等<sup>[10]</sup>通过功能预测发现HIV感染与直肠粘膜微生物群落组成和功能变化有关。由此可见,功能预测可以将肠道微生物群落结构与功能联系起来,更好地阐明发病机理。

目前,关于病害发生后凡纳滨对虾肠道细菌群落结构及功能间的潜在联系及变化趋势尚不清楚。因此,本研究采集健康和患病凡纳滨对虾样品,利用Illumina测序技术分析其肠道微生物菌群在不同健康状态下的响应机制,并用PICRUSt进行功能预测,以期回答:①健康与患病凡纳滨对虾肠道微生物群落结构的变化情况;②肠道细菌群落变化是否进一步改变其功能,即凡纳滨对虾肠道微生物是否存在功能冗余;③能否筛选到敏感微生物种群来指示凡纳滨对虾健康状况。本研究从简单的凡纳滨对虾肠道菌群结构分析,再深入到对其生理学功能的探究,结果有助于揭示凡纳滨对虾肠道菌群对宿主健康的作用,为阐明凡纳滨对虾病害发生的机理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

凡纳滨对虾样品采自宁波市瞻岐椿霖对虾养殖场(29.53 N, 121.5 E)。该养殖厂拥有34个凡纳滨对虾养殖塘,每个养殖塘均采取相同的日常管理措施。从2016年3月放苗开始,我们对其中6个池塘每周采样,分析凡纳滨对虾肠道微生物组成在不同生长阶段的变化特征。于2016年7月,在放苗87 d后,日常监测的6个养殖塘中有3个养殖塘中的凡纳滨对虾病害暴发,症状表现为实验虾停止进食、肠道呈现红色、体色微红、肝脏糜烂,几天后大量死亡。我们从患病

实验虾肠道中分离、纯化可培养细菌,经生理生化及16S *rRNA*基因全长序列比对等方法进行潜在病原菌鉴定,初步确定此次发病是由假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)等细菌性病原感染造成。

我们从发病的3个池塘收集患病实验虾样品,从余下的3个池塘收集健康实验虾样品。为了提高数据可靠性,每个养殖塘用2~3网捕捉凡纳滨对虾,从每个网中挑选4只进行混样,发病组和健康组分别获得8个样品重复。样品采集完成后迅速带回实验室,在实验虾处于鲜活状态时用75%的酒精擦拭虾体表进行消毒,再用0.85%无菌生理盐水洗涤2~3次,在无菌操作条件下用灭菌牙签取其肠道,肠道样品迅速放入-80 °C冰箱保存。

### 1.2 DNA的提取

利用Power soil<sup>®</sup>DNA试剂盒(MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)按照操作手册要求提取实验虾肠道样品中微生物总DNA,并用NanoDrop ND-1000分光光度计(NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)测定所提DNA浓度和纯度。将DNA样品存放于-80 °C冰箱中保存备用。

### 1.3 细菌16S *rRNA*基因扩增及Illumina MiSeq上机测序

取每个样品DNA (50 ng) 作为模板,扩增细菌16S *rRNA*基因的V3~V4高可变区,正向引物341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'),反向引物806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')<sup>[11]</sup>。采用50 μL PCR反应体系,反应参数为:95 °C预变性1 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 25个循环; 72 °C终延伸5 min,每个样品进行3次PCR重复。利用凝胶电泳检测PCR产物。每个样品的扩增产物混合后用PCR片段纯化试剂盒纯化(TaKaRa Biotech, Japan),纯化后的片段用NanoDrop ND-1000分光光度计测定浓度。分别取等量样品,通过Illumina MiSeq平台进行双末端测序(Illumina, San Diego, CA, USA)。

### 1.4 Illumina数据处理

从测序公司获得原始数据,运用Qiime (quantitative insights into microbial ecology, version 1.7.0, <http://qiime.org/>)程序对测序结果进行序列过滤<sup>[12]</sup>,利用usearch算法剔除嵌合体。用UC-

LUST将相似性高于97%的序列聚类为同一个分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)<sup>[13]</sup>。将每个OTU里丰度最高的序列与Greengenes数据库进行比对<sup>[14]</sup>,获得OTUs的分类信息。删除古菌(Archaea)、叶绿体(Chloroplast)、未知序列(unclassified)和在所有样品中只检测到1次的序列(singletons)。为了消除测序深度不同引起的多样性评估偏差,将每个样品的序列数随机选取均一化到14 000条(所有样品中最低测序深度)序列进行后续分析。

### 1.5 功能基因预测

PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)是一种基于16S *rRNA*基因测序结果,通过微生物群落丰富度与数据库比对来预测微生物功能和代谢途径的生物信息学软件包。为了获得细菌代谢功能特征信息,将测序数据经过Greengenes database 13.8数据库比对后生成的OTU Table,根据其16S *rRNA*拷贝数划分的每个OUT丰度将其均一化,再利用PICRUSt (<http://picrust.github.io/picrust/>)分析获得KEGG (Kyoto encyclopaedia of genes and genomes)群落功能分类信息<sup>[8]</sup>。

### 1.6 统计分析

用独立样本 *t* 检验(independent-samples *t* test)比较分析健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群多样性、主要细菌门相对丰度的差异显著性。采用基于Bray-Curtis距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)和群落相似性分析(analysis of similarity, ANOSIM)比较健康与患病凡纳滨对虾分别在肠道微生物群落组成结构和功能上的差异及显著性检测。利用R软件中的“labds”软件包筛选指示实验虾不同健康状况的敏感生物科,选取相关性高于0.90且具有显著性差异( $P<0.05$ )的细菌科以提高数据可靠性<sup>[15]</sup>。为比较病害发生后实验虾生理功能的变化情况,通过计算响应比(response ratio, RR)<sup>[16]</sup>来筛选健康与患病凡纳滨对虾中具有显著性差异的功能代谢过程,计算方法为:99%的置信区间 =  $rr_i \pm 2.58 \sqrt{V_i}$ ; 其中  $rr_i = \ln(\bar{x}_i/\bar{y}_i)$ ,  $V_i = \frac{s_{x_i}^2}{m_x \bar{x}_i^2} + \frac{s_{y_i}^2}{m_y \bar{y}_i^2}$  ( $i=1 \dots n$ );  $\bar{x}_i$ 和 $\bar{y}_i$ 分别表示在患病和健康凡纳滨对虾样品中平均功能代谢过程丰度;  $s_{x_i}$ 和 $s_{y_i}$ 分别表示在患病和健康凡纳滨

对虾样品中功能代谢过程标准偏差;  $m_{x_i}$ 和 $m_{y_i}$ 分别表示在患病和健康凡纳滨对虾样品中功能代谢过程出现的次数。

## 2 结果

### 2.1 细菌群落结构与多样性

通过Qiime流程分析后,16个实验虾肠道微生物样品在97%的相似性水平上共获得5077个OTUs(均一化每个样品14 000条序列)。病害发生伴随着实验虾肠道细菌组成的显著变化,健康和患病凡纳滨对虾中主要菌群为:变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和厚壁菌门(Firmicutes)(图1);平均相对丰度分别为51.2%、27.2%、7.7%、6.2%、5.1%、1.1%,合计占总细菌量的98.5%。其中患病凡纳滨对虾肠道中的 $\gamma$ -变形菌纲和拟杆菌门显著高于健康凡纳滨对虾肠道样品( $P<0.05$ ),而放线菌门、疣微菌门和 $\alpha$ -变形菌纲的相对丰度显著低于健康肠道样品( $P<0.05$ )(表1)。

主坐标分析发现,实验虾肠道菌群结构按照健康状况聚类,其中第一轴和第二轴共同解释了79.4%的群落差异(图2)。群落相似性检验分析表明,健康与患病凡纳滨对虾的肠道群落组成差异极显著( $r=0.935$ ,  $P<0.001$ )。与健康组相比,患病组肠道细菌多样性,包括香农多样性、系统发育多样性和物种多样性水平降低,但差异不显著(表2)。

### 2.2 筛选敏感微生物指示凡纳滨对虾健康状况

我们在前期研究中利用Logistic回归模型比较了不同细菌分类水平指示种群对病害的预测准确率,发现在细菌科的水平上具有较高的预测准确性<sup>[17]</sup>。因此,本文通过指示值法筛选指示凡纳滨对虾健康状况的细菌科。为了提高结果的可靠性,我们挑选指示值大于0.90的种群,共筛选出16个细菌科,这些科主要属于变形菌门、拟杆菌门和浮霉菌门。其中指示健康的细菌科有10个,指示患病的细菌科有6个。利用热图显示指示科在样品中的分布特征,结果显示,各样品能够按健康状况聚类,与健康组相比,患病凡纳滨对虾肠道中假交替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae)相对丰度显著增加( $P<0.001$ ),而蛭弧菌科(Bdellovibrionaceae)、叶

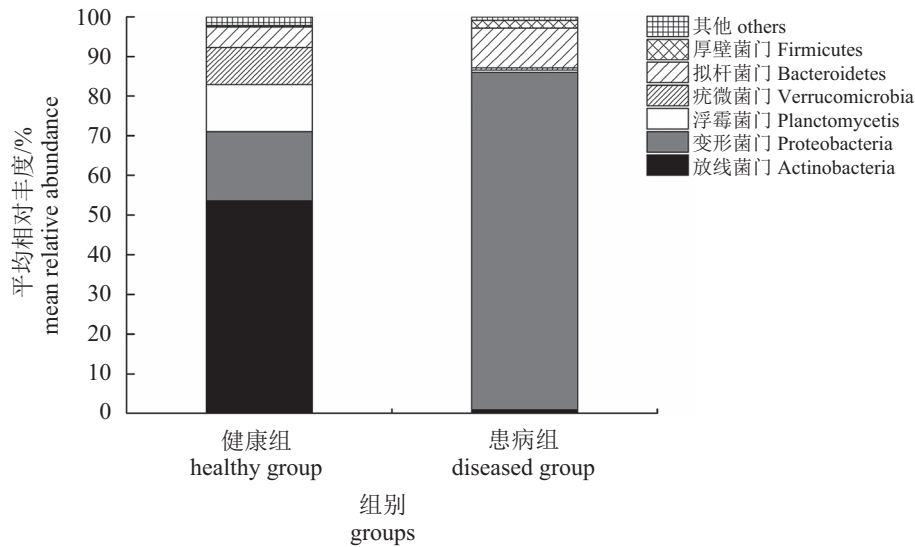


图1 健康和患病凡纳滨对虾肠道样品主要细菌门(平均相对丰度>2%)

Fig. 1 Comparison of the relative abundances of the dominant (mean relative abundance>2%) gut bacterial phyla between healthy and diseased *L. vannamei*

表1 不同健康状况凡纳滨对虾样品主要细菌相对丰度差异

Tab. 1 Relative abundances of the dominant assemblages among healthy and diseased *L. vannamei*

门或纲 Phylum or Class	健康对虾 healthy shrimp	患病对虾 diseased shrimp	P值 P value
放线菌门 Actinobacteria	53.6±30.8	0.8±0.8	<0.001
γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria	13.0±9.6	83.7±6.9	0.002
α-变形菌纲 Alphaproteobacteria	4.4±3.4	1.5±1.1	0.047
浮霉菌门 Planctomycetes	11.8±9.2	0.5±0.7	0.087
疣微菌门 Verrucomicrobia	9.5±7.0	0.6±0.4	0.010
拟杆菌门 Bacteroidetes	5.2±5.6	10.2±5.2	0.008
厚壁菌门 Firmicutes	0.3±0.4	1.9±2.5	0.109
其他 others	2.2±1.4	0.8±0.5	0.032

瘤杆菌科(Phyllobacteriaceae)相对丰度显著减少( $P<0.001$ )(图3)。因此, 这些细菌科可以作为指示凡纳滨对虾健康状况的生物学指标。

### 2.3 细菌群落结构与功能间的关系

基于各样品KEGG比对获得的功能信息组成, 共获得286个代谢功能途径。主坐标分析表明功能组成在健康与患病凡纳滨对虾中有明显差异, 主要由轴1分离(图4-a)。同时群落相似性检验表明, 健康与患病凡纳滨对虾的功能组成差异极显著( $r=0.979$ ,  $P<0.001$ )。线性回归分析显示, 群落组成与功能组成呈极显著正相关( $r=0.826$ ,  $P<0.001$ )(图4-b), 表明对凡纳滨对虾肠道

细菌群落变化显著地改变了其介导的生理功能。

### 2.4 健康与患病凡纳滨对虾肠道微生物群落功能差异

通过响应比分析筛选在健康和患病凡纳滨对虾中发生显著变化的功能, 我们发现患病凡纳滨对虾肠道细菌群落中参与膜转运、复制和修复、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢等多种代谢过程显著减弱。与健康组相比, 患病凡纳滨对虾更容易受到弧菌侵染, 而溶酶体、过氧化物酶等的具有抗菌免疫能力的代谢过程减弱(图5)。



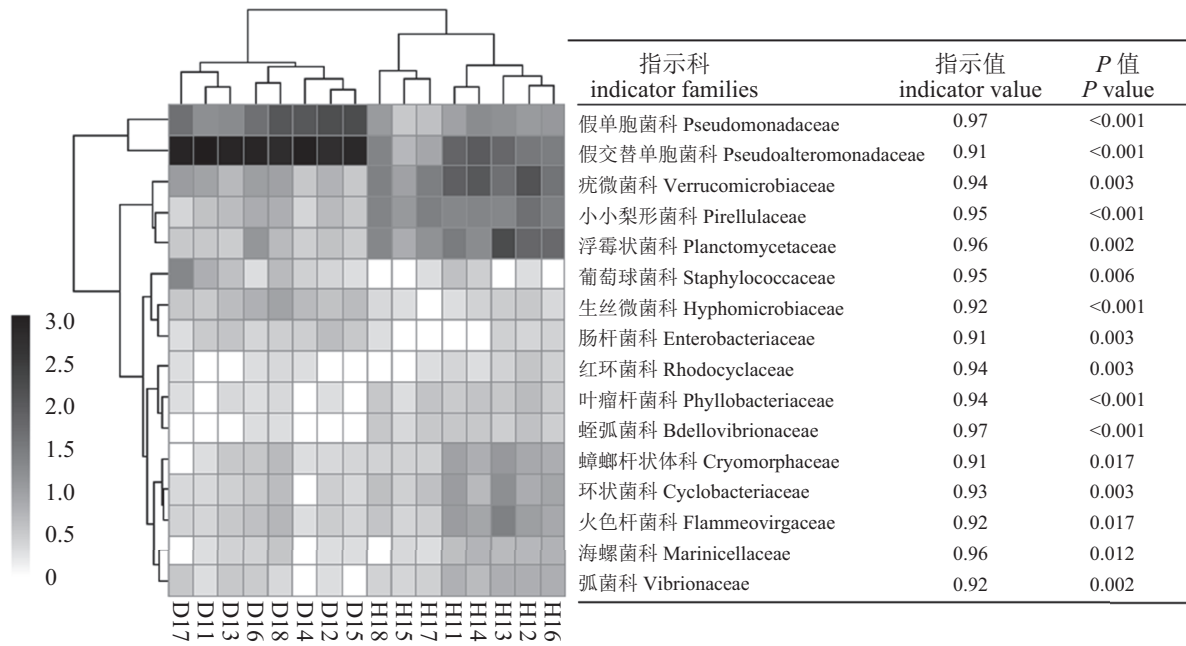


图3 不同健康状况的16种指示物种相对丰度热图

HI. 健康组肠道微生物群落; DI. 患病组肠道微生物群落

Fig. 3 The heat map shows the relative abundances of the 16 screened indicator taxa between healthy and diseased group

HI. intestine microflora from healthy group; DI. intestine microflora from diseased group

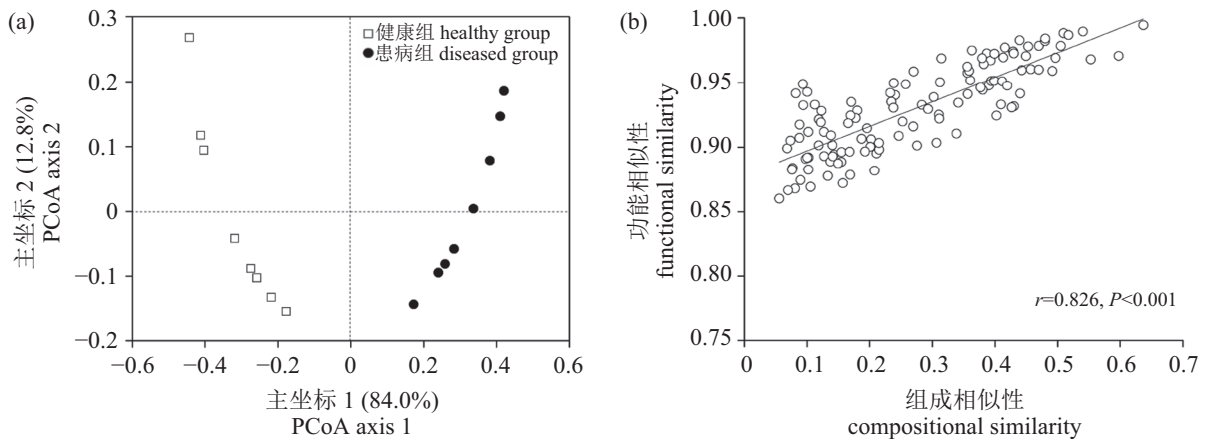


图4 肠道微生物在不同健康状况下功能组成差异(a)以及群落相似性与功能相似性之间的拟合相关性(b)

Fig. 4 Principal coordinates analysis (PCoA) the functional structures of gut bacterial community between healthy and diseased group using Bray-Curtis distance (a), and the correlation between compositional similarities and functional similarities (b)

不准确的。有研究表明对虾肠道细菌群落的变化幅度与疾病的严重程度显著正相关<sup>[6]</sup>。因此,肠道微生物的组成变化可能更好地表征凡纳滨对虾的健康状况。

### 3.2 利用敏感生物科指示凡纳滨对虾健康状况

通过比较健康和患病凡纳滨对虾肠道微生物丰度差异,以期获得敏感的种群来指示和评

估凡纳滨对虾健康状况。我们采用指示值筛选健康和患病凡纳滨对虾肠道菌群中的指示微生物,共筛选到16个细菌科(图3)。值得注意的是,指示科已知的生理功能和生态学特征与病害发生的表型相吻合。例如,弧菌是对虾养殖中最常见的病原菌,其丰度的增加往往会引起对虾疾病的暴发<sup>[24-26]</sup>。近年来由弧菌引起的传染



图 5 响应比分析筛选在健康和患病凡纳滨对虾肠道细菌群落功能差异显著性(99%的置信区间)

\*左侧圆圈表示在患病对虾中该功能代谢丰度减少, 右侧圆圈表示在患病对虾中该功能代谢丰度增加

Fig. 5 Response ratio analysis identification of the KEGG pathways that significantly change between healthy and diseased *L. vannamei* at a 99% confidence interval (CI)

\* Circles at the right column indicate the abundance of the corresponding pathway significantly increased, while those at the left column indicate decreased in diseased *L. vannamei*

性疾病给对虾养殖带来的危害越来越严重<sup>[27-28]</sup>。推测可能是由于弧菌侵染后破坏了对虾原定细菌群的动态平衡, 改变了原有肠道微生物的组成。假交替单胞菌是一种能产生多种胞外活性物质的海洋细菌属, 已有研究证实它具有较强的致病能力, 一些特殊种, 如 *P. teteraodonis* 能产生胞外毒素引起某些鱼类的死亡<sup>[29]</sup>。我们检测到在患病凡纳滨对虾中假交替单胞菌含量显著高于健康组, 因此控制养殖环境中假交替单胞菌的丰度可能是今后维持凡纳滨对虾健康养殖需要关注之处。在健康凡纳滨对虾肠道中蛭弧菌 (*Bdellovibrio*) 相对丰度显著高于患病组, 蛭弧菌对弧菌具有捕食作用, 能够直接裂解弧菌 (*Vibrio* spp.), 对高等生物无毒害作用<sup>[30]</sup>。凡纳滨对虾肠道中蛭弧菌含量的增加可以降低其受弧菌等致病菌侵染的风险。事实上, 对于蛭弧菌的研究不局限于水产养殖领域, 目前已应用于农业、医学及污水治理等领域, 对于农作物及人畜疾

病都有一定的防治效果。芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 具有强抑制有害菌能力, 并能产生拮抗物质, 如抗生素和细菌素, 抑制致病菌的生长; 同时产生的多种消化酶能帮助宿主消化吸收营养物质, 从而起到防治疾病的效果, 已经作为改善凡纳滨对虾健康状况的益生菌<sup>[31]</sup>。因此, 可以通过检测敏感细菌科的动态变化评估凡纳滨对虾的健康状况, 为凡纳滨对虾健康养殖提供参考。

### 3.3 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群功能组成的差异

肠道菌群动态平衡的破坏常伴随着宿主病害的发生, 因此肠道菌群在促进宿主健康中起到重要作用, 且这种观点已被广泛接受。然而, 由于不同的微生物可以执行相似的功能, 因此认为微生物群落存在功能冗余<sup>[32]</sup>。据报道, 不同品种的对虾具有不同的肠道菌群结构, 但这些细菌群落有类似的生物功能<sup>[33]</sup>。因此, 对于病害

伴随的肠道菌群变化如何影响其生理功能还不得而知。本研究发现肠道菌群变化伴随着凡纳滨对虾肠道菌群预测功能的显著变化；细菌群落的结构相似性与功能相似性之间呈显著正相关，表明凡纳滨对虾肠道菌群功能冗余程度相对较低。此外，预测基因功能的变化趋势与病害发生的表型一致。例如，溶酶体是细胞分解和能量代谢的控制中心，其内包含的大量溶菌酶<sup>[34]</sup>，能够作为对虾体内重要的非特异性免疫因子，在激发和维持机体免疫防御中发挥重要作用<sup>[35-36]</sup>。参与该生理过程的丰度降低伴随着多种能量代谢能力的减弱，表现为在患病凡纳滨对虾中参与氨基酸、碳水化合物等多个消化吸收生理过程丰度的显著降低(图5)，进而使分配到免疫系统所需的能量不足，导致实验虾出现炎症及增加患病的风险。过氧化物酶能够利用过氧化氢酶的氧化还原反应将体内有毒物质转变为无毒物质，起到解毒作用，同时过氧化氢酶还参与脂类的合成<sup>[37]</sup>。与健康组相比，患病凡纳滨对虾此代谢过程的相对丰度同样显著降低，另一方面，患病凡纳滨对虾受到霍乱弧菌(*V. cholerae*)侵染的功能基因丰度显著增加。霍乱弧菌能够分泌霍乱肠毒素，导致烈性肠道传染病，对人和动物都具有极高的致死率。霍乱弧菌也是对虾养殖中常见的致病菌，一旦受其感染能够造成对虾大面积死亡<sup>[38]</sup>。因此，对虾病害的发生伴随着肠道菌群的变化，进而降低了与消化吸收和能量代谢相关的功能，导致对虾摄食能力降低和参与免疫反应的能量减少，加重病害。

综上所述，健康与患病凡纳滨对虾肠道微生物群落结构存在显著差异，其生理学功能也发生显著变化，表明肠道微生物具有较低的功能冗余性，且这些变化特征与凡纳滨对虾的病症相吻合，同时筛选到敏感的肠道指示细菌科评估凡纳滨对虾健康状况。尽管目前我们不能建立肠道群落组成、功能和病害的因果关系，但三者间的紧密相关性证实了肠道微生物在维持宿主健康中的重要作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Abid A, Davies S J, Waines P, *et al.* Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1948-1956.
- [ 2 ] Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, *et al.* Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(5): 559-570.
- [ 3 ] Leung T L F, Bates A E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2013, 50(1): 215-222.
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] 段亚飞, 张家松, 董宏标, 等. 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1557-1564.  
Duan Y F, Zhang J S, Dong H B, *et al.* The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1557-1564(in Chinese).
- [ 6 ] Xiong J B, Wang K, Wu J F, *et al.* Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6911-6919.
- [ 7 ] 吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(2): 611-621.  
Wu J F, Xiong J B, Wang X, *et al.* Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(2): 611-621(in Chinese).
- [ 8 ] Loudon A H, Woodhams D C, Parfrey L W, *et al.* Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*)[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(4): 830-840.
- [ 9 ] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S *rRNA* marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [ 10 ] McHardy I H, Li X X, Tong M M, *et al.* HIV infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota[J]. *Microbiome*, 2013, 1: 26.
- [ 11 ] Xiong J B, Zhu J Y, Dai W F, *et al.* Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to



- diagnose the initiation and severity of shrimp disease[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(4): 1490-1501.
- [12] 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.
- [13] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, *et al.* PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2009, 26(2): 266-267.
- [14] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* GreenGenes, a chimera-checked 16S *rRNA* gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [15] Xiong J B, Dai W F, Zhu J Y, *et al.* The underlying ecological processes of gut microbiota among cohabitating retarded, overgrown and normal shrimps[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(4): 988-999.
- [16] Xiong J B, Peng F, Sun H B, *et al.* Divergent responses of soil fungi functional groups to short-term warming[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68(4): 708-715.
- [17] 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.
- [18] 李志勇, 何丽明, 吴杰, 等. 基于PCR-DGGE基因指纹的对虾体内优势细菌组成分析[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 82-86.
- Li Z Y, He L M, Wu J, *et al.* Study on the predominant bacterial community in prawn based on 16S *rDNA* PCR-DGGE fingerprint[J]. *Microbiology*, 2005, 32(3): 82-86(in Chinese).
- [19] 张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(2): 211-218.
- Zhang S J, Zhao X J, Song X L, *et al.* Analysis of the culturable bacteria's quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(2): 211-218(in Chinese).
- [20] 杨坤杰, 王欣, 熊金波, 等. 健康和患病凡纳滨对虾幼虾消化道菌群结构的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1765-1773.
- Yang K J, Wang X, Xiong J B, *et al.* Comparison of the bacterial community structures between healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive tract[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(11): 1765-1773(in Chinese).
- [21] Sangwan P, Kovac S, Davis K E R, *et al.* Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8402-8410.
- [22] 沈海燕, 阮水良, 徐水凌, 等. 克罗恩病患者肠道菌群多样性变化研究初探[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(6): 662-666.
- Shen H Y, Ruan S L, Xu S L, *et al.* Alterations of bacterial diversity of intestinal microbiota in patients with Crohn's diseases[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(6): 662-666(in Chinese).
- [23] Anhê F F, Pilon G, Roy D, *et al.* Triggering *Akkermansia* with dietary polyphenols: a new weapon to combat the metabolic syndrome?[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(2): 146-153.
- [24] Zhang D M, Wang X, Xiong J B, *et al.* Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status[J]. *Ecological Indicators*, 2014, 38: 218-224.
- [25] 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.
- [26] Xiong J B, Zhu J L, 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.
- [27] Kumar B K, Deekshit V K, Raj J R M, *et al.* Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 247-251.
- [28] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3-4): 310-317.
- [29] 席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 108-112.
- Xi Y, Zhu D H, Liu H T, *et al.* Advances on *pseudoalteromonas* species and their extracellular bioactive compounds[J]. *Microbiology*, 2005, 32(3): 108-112(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 4 *Bdellovibrio*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 571-575(in Chinese).

- Chinese).
- [31] 于明超, 李卓佳, 林黑着, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾生长及肠道菌群的影响[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(4): 132-137.
- Yu M C, Li Z J, Lin H Z, *et al.* Effects of dietary *Bacillus* spp. and traditional Chinese medicines on growth and intestinal bacterial flora of shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(4): 132-137(in Chinese).
- [32] Allison S D, Martiny J B. Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(S1): 11512-11519.
- [33] Tzeng T D, Pao Y Y, Chen P C, *et al.* Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132860.
- [34] Settembre C, Fraldi A, Medina D L, *et al.* Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(5): 283-296.
- [35] Fujimoto S, Toshimori-Tsuda I, Kishimoto K, *et al.* Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(4): 709-718.
- [36] 张海波, 谭洪新, 王兴强, 等. 凡纳滨对虾溶菌酶基因在大肠杆菌中的表达和活性检测[J]. 海洋科学, 2009, 33(1): 48-53.
- Zhang H B, Tan H X, Wang X Q, *et al.* Expression of *Litopenaeus vannamei* lysozyme gene in *Escherichia coli* and evaluation of its lytic activity[J]. Marine Sciences, 2009, 33(1): 48-53(in Chinese).
- [37] Dormandy J A, Charbonnel B, Eckland D J, *et al.* Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial[J]. The Lancet, 2005, 366(9493): 1279-1289.
- [38] Haldar S, Chatterjee S, Asakura M, *et al.* Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Non-O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post larvae and juveniles[J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(1): 55-60.

## Characterizing the compositional and functional structures of intestinal microflora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*

YU Weina<sup>1,2</sup>, DAI Wenfang<sup>1,2</sup>, TAO Zhen<sup>1,2</sup>, XIONG Jinbo<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-Efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** To investigate the difference of the compositional and functional structures of the intestinal microflora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*, we screened the intestinal bio-indicators to evaluate the health status of the host, and assess the functional redundancy of the intestinal microflora in response to disease. Based on the Illumina high-throughput sequencing technology, we compared the intestinal microflora between healthy and diseased *L. vannamei*, and analyzed the functional profiles through the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt). In addition, we estimated the correlation between the intestinal microflora structures and predicted the functional compositions. The results showed that the occurrence of disease was associated with significant changes of the bacterial community structures and functional compositions, and there was no significant change in bacterial diversity. Compared with the intestinal microflora of the healthy *L. vannamei*, the relative abundances of Actinobacteria, Planctomycetes and Verrucomicrobia significantly decreased in the diseased *L. vannamei*, whereas, the Gammaproteobacteria and Bacteroidetes exhibited an opposite pattern. In addition, 16 sensitive indicator families were screened, and their occurrences can indicate the health status of the host very well. Furthermore, the abundance of pathways involved in *Vibrio* spp. infection significantly increased in the diseased *L. vannamei*; in contrast, the pathways for antibacterial and immunity, such as lysosome and peroxisome pathways, markedly decreased in diseased shrimp. Notably, there was a significant and positive association in compositional and functional composition between the gut microbiota community, indicating a low functional redundancy of the shrimp gut bacterial community. The occurrence of disease was associated with the change of the intestinal microflora, which subsequently disrupts the bacterial-mediated functions. Further, this study provides sensitive bio-indicators for evaluating the host health status.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; intestinal microbiota; functional composition; indicator families; functional redundancy

**Corresponding author:** XIONG Jinbo, E-mail: xiongjinbo@nbu.edu.cn

**Funding projects:** Zhejiang Province Public Welfare Technology Application Research Project (2016C32063); Project of Science and Technology Department of Ningbo (2017C10044)