

凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物及 抗生素抗性基因多样性分析

洪斌¹, 牛犇¹, 陈萍¹, 李薇¹,
刘海泉^{1,2,3,4}, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306;

4. 上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 探究凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物及抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)种类的差异。通过高通量测序和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术分析2种虾肠道微生物群落结构差异和微生物多样性, 并运用PCR方法检测了2种虾肠道细菌常见38种ARGs的携带情况。结果显示, 获得凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道细菌有效序列分别为42 795和40 713条, 物种注释单元(operational taxonomic unit, OTU)数目分别为124和82, 分类地位明确的细菌种类分别隶属5个门、17个属和5个门、16个属。凡纳滨对虾肠道细菌的优势类群为变形菌门, 所占比例为75.45%, 优势菌属为副球菌属(25.83%)和不动杆菌属(25.24%); 罗氏沼虾肠道细菌的优势类群是厚壁菌门(49.74%), 优势菌属为乳球菌属(49.01%)和弧菌属(29.98%)。凡纳滨对虾肠道细菌(2.19)Shannon指数高于罗氏沼虾肠道细菌(1.78), 表明前者肠道细菌多样性大于后者。DGGE图谱的分析结果与高通量测序一致, 2种虾肠道细菌种类差异很大。PCR结果显示, 凡纳滨对虾肠道细菌携带15种ARGs, 罗氏沼虾肠道细菌携带14种ARGs。本实验表明凡纳滨对虾肠道细菌的群落种类多样性、OTU丰富度、物种总数和ARGs种类均高于罗氏沼虾肠道细菌, 为后续肠道微生物资源的挖掘提供了理论依据。

关键词: 凡纳滨对虾; 罗氏沼虾; 肠道微生物; 细菌多样性; 抗生素抗性基因; 高通量测序; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: S 945.4; Q 939.121

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又名南美白对虾、白对虾, 隶属于对虾科(Penaeidae)、对虾属(*Penaeus*), 因其味道鲜美、营养丰富, 深受广大消费者的青睐, 是集约化高产养殖的优良品种^[1]。近年来, 因其具有生长快、抗病力强、耐高密度养殖等特点, 逐渐成为我国重要养殖虾种。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)又名淡水长臂大虾、马来西亚大虾, 隶属长臂

虾科(Palaemonidae)、沼虾属(*Macrobrachium*), 原产于东南亚和印度, 是重要的淡水经济虾类^[2]。20世纪70年代, 中国水产科学研究院珠江水产研究所从马来西亚、日本引进罗氏沼虾, 并向全国多个省市推广养殖。现在中国罗氏沼虾年产值达300亿元, 产量为 13.5×10^4 t^[3]。

肠道微生物被视为一个特殊的“器官”, 对宿主健康至关重要^[4]。据报道, 稳定的肠道微生物

收稿日期: 2018-08-13 修回日期: 2018-09-18

资助项目: 国家自然科学基金(31571917, 31671779); 上海市科技兴农项目(沪农科攻字2016第1-1号, 沪农科推字2017第4-4号); 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056); 上海市教委曙光计划(15SG48)

通信作者: 赵勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

物区系影响着宿主多种功能,如肠道微生物的建立和感染敏感性。肠道微生物被认为对宿主免疫、营养代谢及适应性等功能有重要影响。研究肠道微生物组成对了解虾肠道微生物生理生化功能、重要经济虾类的养殖繁育及病害防治有重要意义^[5-6],可更好地理解肠道微生物与宿主之间的关系。目前,对水产养殖动物肠道微生物多样性进行的研究很多,如草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[7]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[8]、斑节对虾(*P. monodon*)^[8]和太平洋蓝虾(*Litopenaeus stylirostris*)^[9]等,但对于凡纳滨对虾和罗氏沼虾知之甚少。

高通量测序技术具有高准确度和高通量等优势,随着成本的降低,已成为当前研究环境群落结构差异及微生物多样性的重要手段^[10-11]。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术于1999年首次被应用在食品微生物学中,Ampe等^[12]公布了一份关于发酵玉米面团中微生物空间分布的评估工作,通过直接从样品中提取DNA并扩增16S *rDNA*V3可变区后得到的DGGE图谱,对纯化的DNA片段进行测序从而鉴定乳酸菌。随后全世界科学家将其广泛应用于食品中微生物群落结构的评估^[13]。

近年来,水产养殖中抗生素的频繁使用和不规范使用导致水环境中抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)和耐药致病菌(如超级细菌)的产生^[14]。ARGs作为新兴环境污染物^[15-16],不仅存在于土壤和水环境中,还存在于动物体内,甚至空气和人类饮用水中^[17-19]。携带ARGs的移动遗传元件可以通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)流动到土著细菌或其他环境中,甚至可以转移到人类共生细菌和病原菌中,对人类健康存在潜在的危害^[20]。

本研究通过比较凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物及其抗生素抗性基因种类的差异,利用高通量测序和DGGE技术分析2种虾肠道微生物群落结构差异和微生物多样性,并检测2种虾肠道细菌常见38种ARGs的携带情况。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

实验用凡纳滨对虾(海水养殖)和罗氏沼虾(淡水养殖)均于2017年9月下旬采自上海江阳水产

品市场(上海市宝山区泰和路1700号);所采样品经过冲氧处理后及时运回实验室。在无菌条件下剖取虾肠道置于灭菌离心管中,保存于-80℃超低温冰箱以备DNA提取。

1.2 DNA提取

从-80℃超低温冰箱离心管取凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道样品各5条于1.5 mL离心管,在无菌条件下用电动组织研磨器[OSE-Y10,天根生化科技(北京)有限公司]充分研磨,参照粪便基因组DNA提取试剂盒[DP328-02,天根生化科技(北京)有限公司]说明书步骤提取总DNA。2%琼脂糖凝胶电泳分析样本DNA的完整性,以及Bio Tek多功能酶标仪(Synergy2,美国伯腾仪器有限公司)测定其浓度,达实验要求的总DNA保存于-80℃。

1.3 高通量测序

上述DNA样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序,测序平台为MiSeq PE300,采用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGG-CAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')对细菌16S *rDNA*基因V3~V4区进行PCR扩增。PCR反应体系:5×FastPfu buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, TransStart FastPfu DNA Polymerase 0.4 μL, 正、反向引物(5 μmol/L)各0.8 μL,合格DNA模板2 μL, ddH₂O补充至总体积20 μL。PCR反应条件:95℃预变性3 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 30个循环; 72℃终延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物条带是否存在,最后将PCR产物用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行定量。

1.4 群落结构与多样性分析

用Usearch(version 7.1)软件对数据进行处理,97%相似度水平筛选可操作分类单元(OTU)。根据样品OTU与Silva数据库^[21]的相似性比对结果进行物种注释和分析优势物种的OTU picking,所得结果用GraphPad Prism 5软件绘制群落结构组分图。根据分类学统计结果分析凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物的群落结构和组成比例,绘制Rank-Abundance曲线,以此反映虾肠道所含物种的均匀度和丰富度。最后用Mothur软件对Shannon指数、Chao1、ACE和Simpson指数等进行计算分析。

1.5 样品间相似性聚类分析

基于凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道细菌代表性序列数计算并绘制热图(heat map)^[22], 以反映2种虾肠道微生物在门和属水平上群落组成的相似性和差异性。用R语言Vegan包进行Hclust聚类分析和Vegdist距离计算, 聚类方法为Complete, 距离算法用Bray-Curtis法。

1.6 DGGE技术分析2种虾肠道微生物多样性

以上述提取的基因组DNA为模板, PCR扩增其16S *rDNA*的V3区, 引物为细菌的16S *rDNA*的V3可变区通用引物^[23]。PCR反应条件: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性1 min, 55 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C终延伸5 min, 4 °C保存备用。PCR产物用BIO-RAD Dcode系统

进行DGGE分析, 其中变性梯度为40%~60%, 聚丙烯酰胺胶浓度为8%, 在1×TAE电泳缓冲液中电泳10 h(100 V、60 °C)。凝胶用SYBR Green I染色2次(各10 min), 最后对凝胶图像进行分析。

1.7 抗生素抗性基因检测

本研究选取了6类共38种常见的ARGs: 5种β-内酰胺类ARGs、8种四环素类ARGs、8种氨基糖苷类ARGs、8种喹诺酮类ARGs、5种氯霉素类ARGs和4种磺胺类ARGs作为目的基因, 采用PCR技术对目的基因进行扩增。引物序列、退火温度及反应体系等参考已有文献(表1)^[24-25]。得到的PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 经过NCBI数据库BLAST比对确认其是目的片段。

表 1 38种抗生素抗性基因(ARGs)及其PCR引物

Tab. 1 Thirty-eight antibiotic resistance genes (ARGs) and their PCR primers

基因 genes		引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')	扩增长度/bp amplification length	退火温度/°C annealing temperature
β-内酰胺类ARGs β-lactam ARGs				
	<i>CARB</i>			
	FW	CAAGTACTTTYAAAACAATAGC	534	46
	RV	GCTGTAATACTCCKAGCAC		
<i>SHV</i>	FW	GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC	304	62
	RV	GATTGGCGGCGCTGTTATCGC		
<i>SHV-5</i>	FW	TGTTAGCCACCCTGCCGCT	825	61
	RV	GTTGCCAGTGCTCGATCAG		
<i>ampC</i>	FW	GTGACCAGATACTGGCCACA	822	61
	RV	TTACTGTAGCGCCTCGAGGA		
<i>mecA</i>	FW	TAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTG	733	61
	RV	TAACTAATAGATGTGAAGTCGCT		
四环素类ARGs tetracycline ARGs				
	<i>tetA</i>			
	FW	GCGCTNTATGCGTTGATGCA	387	62
	RV	ACAGCCCGTCAGGAAATT		
<i>tetB</i>	FW	TACGTGAATTTATTGCTTCGG	206	60
	RV	ATACAGCATCCAAAGCGCAC		
<i>tetM</i>	FW	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	60
	RV	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC		
<i>tetO</i>	FW	ACGGARAGTTTATTGTATAACC	171	60
	RV	TGGCGTATCTATAATGTTGAC		
<i>tetQ</i>	FW	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	169	63

· 续表1 ·

基因 genes		引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')	扩增长度/bp amplification length	退火温度/°C annealing temperature
	RV	CGGAGTGTC AATGATATTGCA		
<i>tetS</i>	FW	GAAAGCTTACTATA CAGTAGC	169	50
	RV	AGGAGTATCTACA ATATTTAC		
<i>tetW</i>	FW	GAGAGCCTGCTAT ATGCCAGC	168	64
	RV	GGGCGTATCCACA ATGTTAAC		
<i>tetK</i>	FW	TCGATAGGAACAG CAGTA	169	61
	RV	CAGCAGATCCTACT CCTT		
氨基糖苷类ARGs aminoglycoside ARGs				
<i>aph(2'')-Ib</i>	FW	CTTGGACGCTGAG ATATATGAGCAC	867	55
	RV	GTTTGTAGCAATTC AGAAAACACCCTT		
<i>strA</i>	FW	CTTGGTGATAACGG CAATTC	548	55
	RV	CCAATCGCAGATAG AAGGC		
<i>strB</i>	FW	ATCGTCAAGGGATT GAAACC	509	56
	RV	GGATCGTAGAACAT ATTGGC		
<i>aadA</i>	FW	ATCCTTCGGCGGAT TTTG	283	56
	RV	GCAGCGCAATGAC ATTCTTG		
<i>aadE</i>	FW	ATGGAATTATCCC ACCTGA	386	50
	RV	TCAAAACCCCTATT AAAGCC		
<i>aac(6')-Ib</i>	FW	TATGAGTGGCTAA ATCGAT	395	55
	RV	CCCCTTTCTCGTAG CA		
<i>armA</i>	FW	CCGAAATGACAGTT CCTATC	846	56
	RV	GAAAATGAGTGCCT TGGAGG		
<i>rmtB</i>	FW	ATGAACATCAACG ATGCCCT	769	56
	RV	CCTTCTGATTGGCT TATCCA		
喹诺酮类ARGs quinolone ARGs				
<i>qnrS</i>	FW	CCCCATGCCCGAAG TTATCA	457	59
	RV	ACTGCTTGGAGTGT GTTGGT		
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	FW	ATATGCGGATCCA ATGAGCAACGCAAAAACAAAGTTAG	544	66
	RV	ATAGCGAATTCCTA GGCATCACTGCGTGTTCGCTC		
<i>qnrA</i>	FW	ATTTCACGCCAGG ATTTG	413	56
	RV	GAGATTGGCATTGCT CCAGT		
<i>gryA</i>	FW	CGATGTCGGTCATT GTTGGC	455	61
	RV	ATACCTACGGCGATA CCGGA		
<i>qnrC</i>	FW	TTCGATCGGACTGCT TGTGG	438	59
	RV	AACACATGGTGCAG GGGATT		
<i>qnrD</i>	FW	GCTGGAGCTTGTCAG GGATT	585	59

· 续表1 ·

基因 genes		引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')	扩增长度/bp amplification length	退火温度/°C annealing temperature
	RV	TGCTGCGAGATATCATGCGT		
<i>parC</i>	FW	GCCTAAACAACGCACGGAAA	432	59
	RV	TGACACGGGAGGTAACCAGA		
<i>qnrB</i>	FW	TGGTGCTGTATGCACCGAAT	453	58
	RV	TCATCGCGCTGAAGAAGTGT		
氯霉素类ARGs chloramphenicol ARGs				
<i>catI</i>	FW	GGTGATATGGGATAGTGTT	349	60
	RV	CCATCACATACTGCATGATG		
<i>catII</i>	FW	GATTGACCTGAATACCTGGAA	567	60
	RV	CCATCACATACTGCATGATG		
<i>catIII</i>	FW	CCATACTCATCCGATATTGA	275	60
	RV	CCATCACATACTGCATGATG		
<i>catIV</i>	FW	CCGGTAAAGCGAAATTGTAT	451	60
	RV	CCATCACATACTGCATGATG		
<i>floR</i>	FW	CGCCGTCATTCTCACCTTC	215	50
	RV	GATCACGGGCCACGCTGTGTC		
磺胺类ARGs sulfonamide ARGs				
<i>sulI</i>	FW	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	163	63
	RV	TGAAGTTCGCCCGCAAGGCTCG		
<i>sulII</i>	FW	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	191	63
	RV	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG		
<i>sulIII</i>	FW	TCCGTTTCAGCGAATTGGTGCAG	128	61
	RV	TTCGTTTCAGCCTTACACCAGC		
<i>sulA</i>	FW	TCTTGAGCAAGCACTCCAGCAG	299	61
	RV	TCCAGCCTTAGCAACCACATGG		

2 结果

2.1 高通量测序数据优化分析

通过MiSeq测序平台对凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道细菌的16S *rDNA*基因V3~V4区进行微生物多样性检测, 分别获得细菌总优化序列42 795和40 713条, 碱基平均长度为442 bp。采用Mothur软件制作稀释性曲线(rarefaction curve)。随着测序的进行和序列数目的增加, 曲线逐渐平稳, 表明测序数据量合理可靠(图1)。

2.2 主要微生物群落分布

在Silva数据库进行优化序列相似性比对,

采用RDP classifier贝叶斯算法进行OTU序列分类(97%相似水平), 凡纳滨对虾肠道细菌获得OTU 124个, 罗氏沼虾肠道细菌获得OTU 82个, 共同含有OTU 67个。根据分类学注释结果, 分别在门和属水平进行样品物种丰度的统计分析, 结果显示, 凡纳滨对虾肠道细菌门水平多集中于变形菌门(Proteobacteria) (75.45%)、软壁菌门(Tenericutes) (17.47%), 而厚壁菌门(Firmicutes) (0.76%)、拟杆菌门(Bacteroidetes) (0.28%)、放线菌门(Actinobacteria) (5.52%), 其他及未分类细菌所占比例0.51%(图2-a), 通过种属分类水平上的统计分析, 确定的优势菌属为副球菌属(*Paracoccus*) (25.83%)

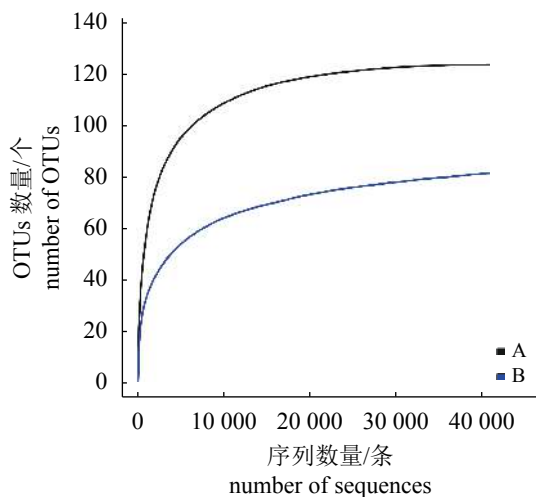


图1 稀释性曲线

A. 凡纳滨对虾肠道细菌; B. 罗氏沼虾肠道细菌; 下同

Fig. 1 Rarefaction curve of *L. vannamei* and *M. rosenbergii* gut bacteria

A. represents rarefaction curve of *L. vannamei* gut bacteria, B. represents rarefaction curve of *M. rosenbergii* gut bacteria; the same below

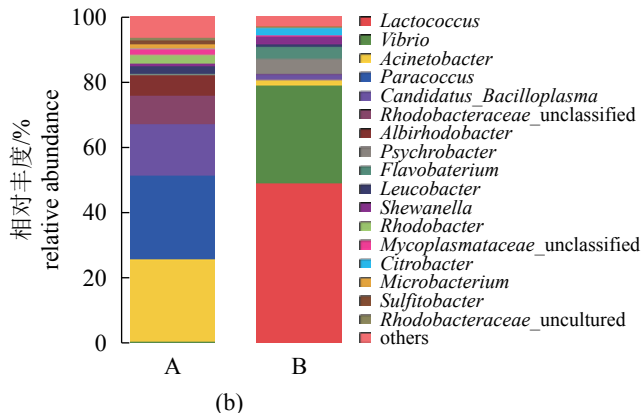
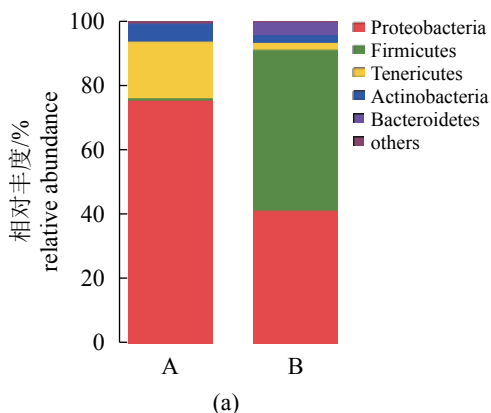


图2 微生物分类学水平的相对丰度统计分析

(a) 细菌门水平分类, (b) 细菌属水平分类; 下同

Fig. 2 Statistical analysis of relative abundance at the microbial taxonomic levels

(a) bacteria phylum level, (b) bacteria genus level; the same below

道细菌(表2)。根据Usearch软件分析每个有效序列OTU所占的丰度比例绘制heat map, 聚类结果显示, 凡纳滨对虾肠道细菌种类和数量均多于罗氏沼虾肠道细菌, 2个样品肠道微生物相似度不高(图3)。

2.4 DGGE图谱分析

本实验采用PCR-DGGE技术扩增16S *rDNA*的V3区目的片段, 以探讨不同虾肠道中细菌的分布是否具有相似性。结果显示, 凡纳滨对虾和罗氏

和不动杆菌属(*Acinetobacter*) (25.24%); 罗氏沼虾肠道细菌门水平主要为变形菌门(41.46%)、厚壁菌门(49.74%)、拟杆菌门(4.21%)、软壁菌门(2.34%)和放线菌门(2.12%), 其他及未分类细菌所占比例为0.14%(图2-b), 优势菌属为乳球菌属(*Lactococcus*) (49.01%)和弧菌属(*Vibrio*) (29.98%)。

2.3 微生物多样性及相似性聚类分析

将获得的凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道细菌有效序列进行抽平分析, 各抽40 713条序列进行比对, 获得分类学地位明确的细菌种类分别隶属5个门、17个属和5个门、16个属, 采用Mothur软件进行多样性指数统计分析(Shannon指数、Chao指数、ACE指数和Simpson指数), 测序结果覆盖率均在99.97%以上, 表明数据有效可靠。凡纳滨对虾肠道细菌(2.19) Shannon指数高于罗氏沼虾肠道细菌(1.78), 表明前者肠道细菌多样性大于后者。从整体来看, 凡纳滨对虾肠道细菌OTU丰富度、物种总数与群落多样性指数高于罗氏沼虾肠

沼虾肠道细菌DGGE图谱差异较大, 二者条带的数量、所示位置及亮度均具有差异, 表明不同虾肠道中的细菌种类、优势菌种均不同。DGGE图谱分析结果与高通量测序所得结果一致, 2种虾肠道细菌种类差异较大(图4)。

2.5 肠道细菌ARGs检出情况

本实验共检测了6大类ARGs, 凡纳滨对虾肠道细菌携带15种ARGs, 罗氏沼虾肠道细菌携带14种ARGs, 6大类均有检出(表3, 图5)。凡纳

表 2 凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物多样性统计分析

Tab. 2 Statistical analysis of microbial diversity in *L. vannamei* and *M. rosenbergii*

样本 samples	有效读数 effective reads	OTU	Ace指数 Ace index	Chao指数 Chao index	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index
凡纳滨对虾肠道细菌 <i>P. vannamei</i> gut bacteria	40 713	124	124	124	2.79	0.103 9
罗氏沼虾肠道细菌 <i>M. rosenbergii</i> gut bacteria	40 713	82	90	95	1.78	0.296 7

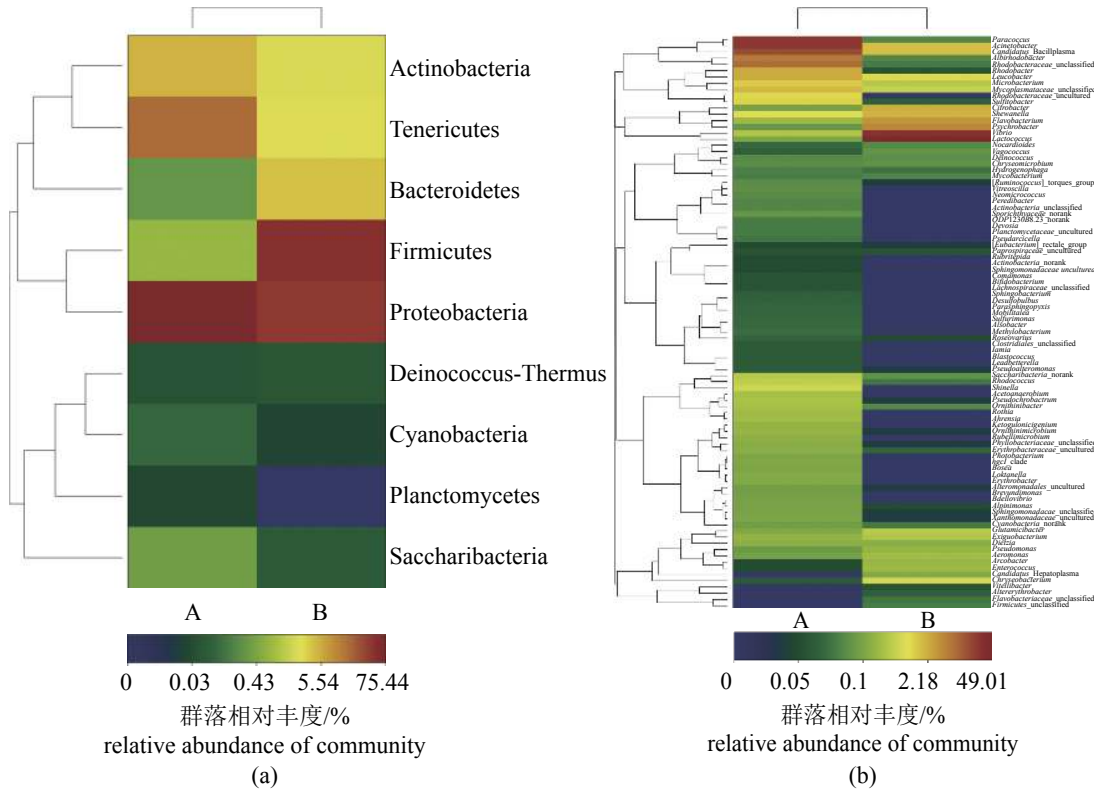


图 3 不同分类水平下的多样本热图与相似性分析

Fig. 3 Microbial community heatmap analysis and multiple samples similarity tree



图 4 DGGE图谱

Fig. 4 DGGE fingerprint

滨对虾肠道细菌检测出SHV、ampC、tetA、tetB、tetM、tetS、strA、strB、aadA、aadE、aac(6')-Ib、gryA、catII、floR、sulII, 而罗氏沼虾肠道细菌检测了SHV、SHV-5、tetA、tetM、tetO、tetS、aadA、aadE、qnrS、gryA、floR、sulI、sulII和sulIII, 体现了抗性基因存在的多样性。其中SHV、tetA、tetM、tetS、aadA、aadE、gryA、floR和sulII是二者均存在的抗性基因。

3 讨论

肠道微生物是肠道的重要组成部分, 在维持进化、机体代谢及发育等方面发挥重要作用^[26]。本实验通过高通量和DGGE技术对2种不同虾肠道微生物多样性和菌落结构进行了研究, 结果

表 3 凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道细菌抗性基因 ARGs 检出情况

Tab. 3 Detection occurrence of ARGs in *L. vannamei* and *M. rosenbergii* gut bacteria

抗性基因 ARGs	凡纳滨对虾肠道细菌 <i>P. vannamei</i> gut bacteria	罗氏沼虾肠道细菌 <i>M. rosenbergii</i> gut bacteria
β-内酰胺类ARGs (β-lactam ARGs)		
CARB	0/10 (0)	0/10 (0)
SHV	4/10 (40%)	10/10 (100%)
SHV-5	0/10 (0)	2/10 (20%)
<i>ampC</i>	3/10 (30%)	0/10 (0)
<i>mecA</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
四环素类ARGs (tetracycline ARGs)		
<i>tetA</i>	10/10 (100%)	10/10 (100%)
<i>tetB</i>	8/10 (80%)	0/10 (0)
<i>tetM</i>	4/10 (40%)	2/10 (20%)
<i>tetO</i>	0/10 (0)	5/10 (50%)
<i>tetQ</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>tetS</i>	10/10 (100%)	10/10 (100%)
<i>tetW</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>tetK</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
氨基糖苷类ARGs (aminoglycoside ARGs)		
<i>aph (2'')-Ib</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>strA</i>	10/10 (100%)	0/10 (0)
<i>strB</i>	10/10 (100%)	0/10 (0)
<i>aadA</i>	3/10 (30%)	10/10 (100%)
<i>aadE</i>	3/10 (30%)	8/10 (80%)
<i>aac (6')-Ib</i>	2/10 (20%)	0/10 (0)
<i>armA</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>rmtB</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
喹诺酮类ARGs (quinolone ARGs)		
<i>qnrS</i>	0/10 (0)	10/10 (100%)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>qnrA</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>gryA</i>	10/10 (100%)	10/10 (100%)
<i>qnrC</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>qnrD</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>parC</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>qnrB</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
氯霉素类ARGs (chloramphenicol ARGs)		
<i>catI</i>	0/10 (0)	0/10 (0)

· 续表3 ·

抗性基因 ARGs	凡纳滨对虾肠道细菌 <i>P. vannamei</i> gut bacteria	罗氏沼虾肠道细菌 <i>M. rosenbergii</i> gut bacteria
<i>catII</i>	2/10 (20%)	0/10 (0)
<i>catIII</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>catIV</i>	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>floR</i>	10/10 (100%)	3/10 (30%)
磺胺类ARGs (sulfonamide ARGs)		
<i>suII</i>	0/10 (0)	10/10 (100%)
<i>suIII</i>	10/10 (100%)	10/10 (100%)
<i>suIV</i>	0/10 (0)	4/10 (40%)
<i>suA</i>	0/10 (0)	0/10 (0)

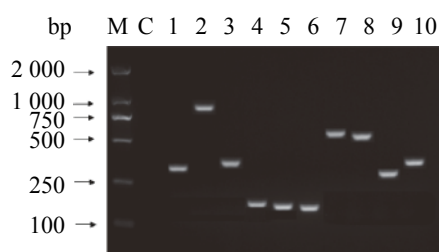


图5 凡纳滨对虾肠道细菌部分ARGs的PCR检测结果

Fig. 5 Detection of gut bacteria ARGs in *L. vannamei* by PCR

M. D2000 Marker; C. control; 1. *SHV*; 2. *ampC*; 3. *tetA*; 4. *tetB*; 5. *tetM*; 6. *tetS*; 7. *strA*; 8. *strB*; 9. *aadA*; 10. *aadE*

发现, 凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物种类差异显著, 且凡纳滨对虾肠道细菌的群落种类多样性、OTU丰富度和物种总数均高于罗氏沼虾肠道细菌。凡纳滨对虾肠道细菌的优势类群是变形菌门, 所占比例为75.45%, 其也常见于其他虾肠道中, 比如墨吉对虾(*P. merguensis*)^[27]、斑节对虾^[8]和太平洋蓝虾^[9]; 而罗氏沼虾肠道细菌的优势类群是厚壁菌门(49.74%), 其也常见上述虾肠道中。变形菌门和厚壁菌门可能是水产养殖动物中的优势菌群。凡纳滨对虾肠道细菌优势菌属为副球菌属(25.83%)和不动杆菌属(25.24%), 而罗氏沼虾肠道细菌优势菌属为乳球菌属(49.01%)和弧菌属(29.98%)。这与之前报道的草鱼肠道中的优势菌属为鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*), 丰度超过50%^[28]的结论有所不同。有研究表明, 当鱼类在高密度养殖时, 肠道中鲸杆菌属的相对丰度将增加7~11倍^[29]。凡纳滨对虾肠道中的鲸蜡菌属丰度可能与低放养密

度有关。不同水产养殖动物, 其肠道优势菌属不同, 可能与宿主摄食、生长环境、饲养密度和水质有关, 反映了宿主抗病性和生长速度的异质性。利用肠道宏基因组测序技术开展肠道微生物与宿主免疫和宿主食性2个方面是未来研究可推进的方向。

水产养殖中抗生素的频繁使用导致水环境中ARGs出现, 这可能对水生动物的敏感细菌产生选择性压力^[30-31]。本实验发现, 凡纳滨对虾肠道环境中存在15种ARGs, 罗氏沼虾肠道中存在14种ARGs, 说明ARGs已经广泛存在于水产养殖动物肠道中。细菌可通过接合、噬菌体转导和自然转化的水平基因转移途径将遗传信息传递给彼此^[32]。最近的研究表明, 基因转移在肠道中很常见, 抗生素抗性基因水平转移是基因组中可移动遗传因子从一株菌株转移到另一株菌株中, 从而使后者获得该抗生素抗性的过程。因此, 通过食物链关系, 虾等水产养殖动物肠道食源性致病菌中携带的ARGs转移到人类肠道微生物中, 将对人类健康产生潜在的危害和将增加治疗细菌感染的难度。

参考文献:

- [1] 张高静, 韩丽萍, 孙剑锋, 等. 凡纳滨对虾营养成分分析与评价[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 254-260.
Zhang G J, Han L P, Sun J F, et al. Analysis and evaluation of nutritive composition in *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology, 2013, 13(8): 254-260(in Chinese).
- [2] New M B, Singholka S. Freshwater prawn farming: a

- manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*[R]. FAO Fisheries Technical Paper, 1982.
- [3] 杨国梁, 陈雪峰, 王军毅, 等. 罗氏沼虾产业在中国持续增长的经济与社会原因分析[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2011, 30(5): 450-457.
- Yang G L, Chen X F, Wang J Y, *et al.* Social and economical factors of sustained growth of *Macrobrachium rosenbergii* industry in Mainland China[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2011, 30(5): 450-457(in Chinese).
- [4] Li X H, Zhou L, Yu Y H, *et al.* Composition of gut microbiota in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) varies with host development[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(1): 239-249.
- [5] Wu S G, Gao T H, Zheng Y Z, *et al.* Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Aquaculture*, 2010, 303(1-4): 1-7.
- [6] Ravel J, Blaser M J, Braun J, *et al.* Human microbiome science: vision for the future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013[J]. *Microbiome*, 2014, 2(1): 16.
- [7] Li T T, Long M, Gatesoupe F J, *et al.* Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(1): 25-36.
- [8] Rungrasamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, *et al.* Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91853.
- [9] Cardona E, Gueguen Y, Magré K, *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 157.
- [10] 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(1): 125.
- [11] You J, Wu G, Ren F P, *et al.* Microbial community dynamics in Baolige oilfield during MEOR treatment, revealed by Illumina MiSeq sequencing[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(3): 1469-1478.
- [12] Ampe F, ben Omar N, Moizan C, *et al.* Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5464-5473.
- [13] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(3): 297-314.
- [14] Vignesh R, Karthikeyan B S, Periyasamy N, *et al.* Antibiotics in aquaculture: an overview[J]. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 2011: 161-189.
- [15] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [16] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1499-1505.
- Luo Y, Zhou Q X. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8): 1499-1505(in Chinese).
- [17] Allen H K, Donato J, Wang H H, *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(4): 251-259.
- [18] 巴永兵, 娄阳, 赵飞, 等. 水产品批发市场中抗生素抗性基因的污染分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(8): 800-806.
- Ba Y B, Lou Y, Zhao F, *et al.* Research of the pollution of antibiotic resistance genes in aquatic products wholesale market[J]. *Journal of Food Science & Biotechnology*, 2017, 36(8): 800-806(in Chinese).
- [19] 李欢, 张昭寰, 汤荣, 等. 食品与临床分离的致病性副溶血性弧菌耐药性比较[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(11): 1006-1012.
- Li H, Zhang Z H, Tang R, *et al.* Comparison of antimicrobial resistance of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and clinical samples[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2016, 32(11): 1006-1012(in Chinese).
- [20] Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 711-721.
- [21] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D590-D596.
- [22] Jami E, Israel A, Kotser A, *et al.* Exploring the bovine

- rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. *ISME Journal*, 2013, 7(6): 1069-1079.
- [23] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S *rRNA*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [24] Lou Y, Liu H Q, Zhang Z H, *et al.* Mismatch between antimicrobial resistance phenotype and genotype of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood[J]. *Food Control*, 2016, 59: 207-211.
- [25] Li H, Tang R, Lou Y, *et al.* A comprehensive epidemiological research for clinical *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1043.
- [26] Vaughan E E, Schut F, Heilig H G H J, *et al.* A molecular view of the intestinal ecosystem[J]. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2000, 1(1): 1-12.
- [27] Oxley A P A, Shipton W, Owens L, *et al.* Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(2): 214-223.
- [28] Li T T, Long M, Ji C, *et al.* Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30606.
- [29] Zhou Z, He S, Liu Y, *et al.* Do stocking densities affect the gut microbiota of gibel carp *Carassius auratus gibelio* cultured in ponds?[J]. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 2011, (S1): 003.
- [30] Akinbowale O L, Peng H, Barton M D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 1103-1113.
- [31] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [32] Frost L S, Leplae R, Summers A O, *et al.* Mobile genetic elements: the agents of open source evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 722-732.

Diversity of gut microbiota and antibiotic resistance genes in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*

HONG Bin¹, NIU Ben¹, CHEN Ping¹, LI Wei¹,
LIU Haiquan^{1,2,3,4}, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China;

3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai),
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;

4. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To compare the differences in gut microbiota and antibiotic resistance genes (ARGs) between *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*, microbiota community structure and microbiota diversity of two shrimps were analyzed by high-throughput sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and 38 kinds of ARGs in the gut bacteria of two shrimps were detected. The effective bacterial sequences of *L. vannamei* and *M. rosenbergii* were 42 795 and 40 713. The results showed that the numbers of operational taxonomic units (OTUs) were 124 and 82, and the bacterial types with clear classification status were 5 phyla, 17 genera and 5 phyla, 16 genera. The dominant group in the gut bacteria of *L. vannamei* is Proteobacteria, which accounts for 75.45%. The dominant genera are *Paracoccus* (25.83%) and *Acinetobacter* (25.24%). The dominant group in gut bacteria of *M. rosenbergii* is Firmicutes (49.74%), and the dominant genera are *Lactococcus* (49.01%) and *Vibrio* (29.98%). The Shannon index of the gut bacteria (2.19) of *L. vannamei* was higher than that of *M. rosenbergii* (1.78), indicating that the gut bacteria diversity of the former was greater than that of the latter. The analysis results of DGGE fingerprint were consistent with those of high-throughput sequencing, and the bacterial diversity of the two shrimps was significantly different. The PCR results showed that the gut bacteria of *L. vannamei* carried 15 ARGs and gut bacteria of *M. rosenbergii* carried 14 ARGs. Our study revealed that the community diversity, OTU richness, total number of species and ARGs in the gut bacteria of *L. vannamei* were higher than those of *M. rosenbergii*, which provided a theoretical basis for the subsequent excavation of gut microbial resources.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Macrobrachium rosenbergii*; gut microbiota; microbiota diversity; antibiotic resistance genes; high throughput sequencing; denaturing gradient gel electrophoresis

Corresponding author: ZHAO Yong. E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31571917, 31671779); Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (G20160101, T20170404); Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-10-E00056); The “Dawn” Program of Shanghai Education Commission (15SG48)