



## 凡纳滨对虾养殖环境及肠道微生物群落特征分析

金若晨<sup>1</sup>, 江敏<sup>1,2\*</sup>, 孙世玉<sup>1</sup>, 戴习林<sup>2,3</sup>, 吴昊<sup>2,3</sup>,  
周俊芳<sup>4</sup>, 于忠利<sup>5</sup>, 张峰<sup>6</sup>

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

4. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

5. 上海市奉贤区水产技术推广站, 上海 201419;

6. 上海思阳水产养殖合作社, 上海 201400)

**摘要:** 为探究凡纳滨对虾养殖过程中其肠道和养殖环境微生物群落的结构及变化, 本实验采用 Illumina MiSeq 测序平台, 基于 16S *rRNA* 基因的测序结果, 对 46 和 86 d 虾龄的凡纳滨对虾肠道以及养殖水样、底泥中的微生物群落进行分析。结果显示, 86 d 时微生物 Shannon-Wiener 多样性指数显著高于 46 d, 水样中的 Shannon-Wiener 指数显著低于底泥和凡纳滨对虾肠道; 有 35 个门、70 个纲、152 个目、274 个科以及 420 个属在水样、底泥和虾肠道中均能检测到, 其中虾肠道和底泥间共有菌类较水样中更多。微生物群落随养殖时间增加发生变化, 46 与 86 d 的差异性门类为放线菌门、绿菌门、丝状杆菌门、浮霉状菌门和 TM6, 相对丰度随时间增加而增高。水样、底泥和虾肠道中有相对固定的优势菌群, 在水样、底泥和虾肠道中主要的门类均为变形菌门、拟杆菌门和放线菌门, 优势纲类为  $\alpha$  变形菌纲、 $\beta$  变形菌纲以及放线菌纲, 除此以外, 虾肠道与底泥共有的优势纲为  $\delta$  变形菌纲、 $\gamma$  变形菌纲以及芽单胞菌纲; 从目、科、属的分类水平上看, 水样、底泥和虾肠道中菌类相对丰度各异, 鲜有明显重叠的优势菌类, 在水样、底泥和虾肠道中均为一种未分类的属占优势地位, 水样中优势属为 *hgcl\_clade*, 底泥和虾肠道中优势属为 *Ambiguous\_taxa*。研究结果进一步解释了虾肠道和环境微生物群落结构之间的相关性以及随虾龄增长呈现的差异性。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 养殖水样; 底泥; 虾肠道; 微生物群落结构; 多样性

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾, 原产于太平洋沿岸水域秘鲁北部至墨西哥桑诺拉一带, 目前已成为我国对虾养殖中占绝对优势的主要养殖种类。据统计, 2017 年我国淡水产品总产量为 3 123.6 万 t, 其中凡纳滨对虾产量高达 59.15 万 t<sup>[1]</sup>。地处长江三角洲的

上海水产养殖总面积约 253.3 km<sup>2</sup>, 其中凡纳滨对虾精养池塘近 80 km<sup>2</sup>[2]。随着养殖密度及规模的增大, 凡纳滨对虾的病害问题也日益增多, 制约了凡纳滨对虾养殖的健康发展。

肠道是对虾体内最重要的消化吸收器官, 大量微生物寄居其中, 与宿主相互依赖、相互

收稿日期: 2020-03-12 修回日期: 2020-04-20

资助项目: 虾类绿色配合饲料的研发与应用 [沪农科创字 (2019) 第 3-5 号]; 上海市虾类产业技术体系建设项目 [沪农科产字 (2014) 第 5 号]; 上海市高校知识服务平台项目 (ZF1206)

通信作者: 江敏, E-mail: mjiaing@shou.edu.cn

制约。肠道微生物与对虾的关系对于生产和疾病预防有特定价值。近年来,对肠道微生物的研究备受关注<sup>[3]</sup>。有研究表明,不同结构和组成的肠道微生物群落能影响对虾的营养代谢以及对外源病原菌感染的敏感性<sup>[4-5]</sup>;对虾发病后肠道微生物群落多样性会降低<sup>[6]</sup>。

影响肠道微生物群落结构的因素很多,杨莺莺等<sup>[7]</sup>认为,外部环境对对虾肠道细菌的定殖具有选择性,水质的突变极易引起对虾肠道菌群的平衡失调,使其更易被病原菌入侵,暴发疾病。王元等<sup>[8]</sup>发现,在海水和淡水2种养殖条件下,凡纳滨对虾的肠道菌群结构差异较大。黄雪敏等<sup>[9]</sup>发现凡纳滨对虾育苗池水样弧菌显著高于健康池,而水温和磷酸盐含量显著高于健康池,pH和亚硝氮含量显著低于健康池。吴金凤等<sup>[10]</sup>则认为NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N和叶绿素a与凡纳滨对虾发病塘细菌群落丰度呈正相关,而PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P与健康塘细菌群落的丰度呈正相关,并筛选出了指示对虾健康状况的细菌种群。

池塘底泥在水生生物生长过程中承担着营养元素的沉积与再循环作用,含有丰富的有机及无机营养物,因而菌群结构复杂,且其丰富度也受到许多因素的制约。秦伟等<sup>[11]</sup>发现,克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)池塘的底泥菌群中的优势菌群是变形菌门,但其丰富度和多样性随着养殖时间的推移均逐渐降低,且影响水样和底泥中细菌丰富度的主要因素是不同的。夏海峰等<sup>[12]</sup>对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道及环境底泥菌群的研究得出菌群种类在二者之间有显著差异,但随季节变化二者间的菌系变化趋势相似。

目前,高通量测序已成为研究微生物群落的主要技术之一,而对虾肠道微生物的群落结构在养殖池塘的水和底泥环境的影响下,或将决定对虾的健康状况。因此,本研究采用Illumina MiSeq测序平台对养殖过程中凡纳滨对虾

的肠道、养殖水样及其底泥的微生物进行16S rRNA基因序列测定,以期得出三者微生物群落结构及其多样性,进一步理解养殖环境对肠道微生物的影响,为养殖场提高凡纳滨对虾的养殖质量和产量提出相应的建议。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖场情况

实验在上海市奉贤区某养殖专业合作社(N30°52'6.87", E121°22'52.96")进行。该养殖场拥有15个养殖塘,其中一个为淡化池。每个池塘占地面积约4333 m<sup>2</sup>,平均水深1.5 m,配备4台叶轮式增氧机和1部底部微孔增氧装置。增氧机一般情况下每天开16 h。在养殖初期水深1.2 m,放入虾苗之后,池塘根据实际情况排水、加水。凡纳滨对虾虾苗运抵后于2018年3月18日放入淡化池,经20 d淡化后分入各个池塘,每个池塘放入约40万尾虾,期间投喂幼虾配合饲料,每天上午喂1次,28 d后开始投喂成虾配合饲料,每天上午、下午各1次。

### 1.2 样品采集

本研究选取3个池塘作为实验塘,根据养殖过程中对虾是否检测出虾血细胞虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)、是否有发病等情况分为健康塘、发病塘和带病塘(表1)。分别在养殖46和86 d时采集池塘水、底泥及凡纳滨对虾肠道样品各6个,共18个样品,采样时间为上午。

采集水样时,于每口塘沿边设1个固定采样点,远离食台和增氧机,距离岸边约1 m,分别于水面下25 cm处采集1 L水样,用于水质监测;水样用混合纤维膜(孔径0.22 μm)过滤,滤膜于-20 °C冰箱保存用于微生物检测。

在采样点,用已灭菌的采泥器采集底泥

表1 实验塘基本情况

Tab. 1 Basic information of *L. vannamei* aquaculture ponds

组别 groups	养殖天数/d growth days			
	46	86	91	102
健康塘 healthy pond	健康	无死虾, 无虹彩病毒		收虾
发病塘 diseased pond	健康	出现死虾, 检测出携带虹彩病毒	收虾	
带病塘 virus carrying pond	健康	无死虾, 但检测出携带虹彩病毒		收虾

表层 0~10 cm 的样品, 置于无菌自封袋中, 于 -20 °C 冰箱保存并尽快提取 DNA 用于 PCR 扩增。

每个塘采集 5 尾凡纳滨对虾, 放于冰盒中运输至实验室, 在无菌环境下对体表进行消毒、解剖, 收集凡纳滨对虾的肠道内容物, 将每个塘的 5 尾虾的肠道内容物作为 1 个样本, 立即放入 -20 °C 冰箱保存。实验结束后将水样、泥样及虾肠道样品送至上海欧易生物医学科技有限公司进行高通量测序。

### 1.3 水质测定方法

水质采集及保存遵循《水质采样样品的保存和管理技术规定》(GB 12999—91)。水样理化因子采用 YSI-ProDO 测定溶解氧 (DO) 和水温 (T), 雷磁 PHBJ-260 测定 pH, 总氮 (TN)、总氨氮 (TAN)、亚硝氮 ( $\text{NO}_2^-$ -N)、硝酸盐氮 ( $\text{NO}_3^-$ -N)、总磷 (TP)、活性磷 (AP)、叶绿素 a (Chl-a) 和高锰酸盐指数 ( $\text{COD}_{\text{Mn}}$ ) 分别按碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 (GB11894—89)、纳氏试剂比色法 (GB 7479—87)、重氮-偶氮比色法 (GB 7493—87)、紫外分光光度法 (HJ/T 346—2007)、钼酸铵分光光度法 (GB 11893—89)、磷钼蓝法 (GB 11893—89)、热乙醇法<sup>[13]</sup>及碱性高锰酸盐法 (GB 11892—89) 于当天检测。

### 1.4 DNA 提取和 PCR 扩增

使用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, US) 提取样品 DNA 后, 进行琼脂凝胶电泳及 DNA 浓度检测, 将浓度稀释至 1 ng/ $\mu\text{L}$  的 DNA 为模板, 用带 Barcode 的特异引物和 Takara Ex Taq (TaKaRa) 高保真酶对细菌 16S *rRNA* 基因进行 PCR 扩增。根据 16S *rRNA* 基因序列特点及 MiSeq 平台的测序要求, 针对 V3~V4 区域设计特异引物进行 PCR 扩增, 前端引物为 343F-5'-TACGGRAGGCAGCAG-3', 后端引物为 798R-5'-AGGGTATCTAATCCT-3'。PCR 反应体系 (30  $\mu\text{L}$ ): 2×Gflex PCR Buffer 15  $\mu\text{L}$ , Template DNA 1  $\mu\text{L}$ , Forward Primer (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Reverse Primer (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ , 补水至 30  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 26 个循环, 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用电泳检测, 二轮 PCR 扩增后用磁珠纯化, 将产物进行 Qubit 定量, 据 PCR 产物浓度进行等量混样后, 用 MiSeq 平台测序分析。

### 1.5 高通量测序和数据分析

测序数据的质控步骤: 对 Illumina MiSeq 测序所得的原始数据用 Trimmomatic<sup>[14]</sup> 软件去杂, 所得的双端数据使用 FLASH<sup>[15]</sup> 软件进行拼接; 对拼接后的原始数据用 QIIME 中的 split\_libraries<sup>[16]</sup> 软件继续进行精准去杂, 以去除低质量以及模糊的碱基序列; 而后用 UCHIME<sup>[17]</sup> 软件去除嵌合体序列, 得到较优质的有效序列用于后续分析。质控完成, 获得样本序列总数。

后续的生物信息学分析包括可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类分析和物种分类学分析。使用 Vsearch<sup>[18]</sup> 软件, 对有效序列按照 97% 的相似度进行 OTU 分类, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列, 与 Greengenes 数据库进行对比, 物种比对注释使用 RDP classifier 软件, 保留置信区间大于 0.7 的注释结果。在此基础上对 OTU 进行 alpha 多样性指数分析; 基于分类学的信息, 分别在门、纲、目、科、属的分类水平上统计样本的群落丰度和组成, 并用微生物多元变量分析得出各个分类水平上的差异性物种。

Alpha 多样性指数用来反映物种多样性, 主要包括 Shannon-Wiener 指数和 Simpson<sup>[19]</sup> 指数。Shannon-Wiener 和 Simpson 指数分别反映样品个体和群落的多样性, 将 alpha 指数进行 boxplot 分析, 在统一深度下计算不同样本的多样性指数, 通过 ANOVA 进行差异性分析, 差异性以  $P < 0.05$  表示。

用 Excel 2007 处理数据, 并用 SPSS 25.0 软件对不同养殖时间水质理化因子和微生物菌群的相对丰度数据分别进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并作 LSD 多重比较, 差异性以  $P < 0.05$  表示。

## 2 结果

### 2.1 水质因子

同一采样日, 3 个池塘的 11 个水质理化因子均无显著性差异 (表 2)。而比较同一池塘第 46 与 86 天的数据时发现, 活性磷与硝酸盐氮 2 项指标存在显著性差异, pH、总氮与亚硝氮 3 项存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), pH 值在 86 d 时极显著低于 46 d, 而总氮与亚硝氮值则极显著高于 46 d ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

表 2 凡纳滨对虾养殖池塘在养殖 46 与 86 d 时的水质理化因子  
Tab. 2 Water quality of *L. vannamei* aquaculture ponds at day 46 and day 86

水质因子 water factors	46 d			86 d			P 值 P value
	健康塘 healthy pond	发病塘 diseased pond	带病塘 virus carrying pond	健康塘 healthy pond	发病塘 diseased pond	带病塘 virus carrying pond	
温度/°C T	28.10	25.70	28.50	29.30	29.00	29.20	0.120
溶解氧/(mg/L) DO	7.28	6.68	6.77	6.78	5.86	6.34	0.147
酸碱度 pH	8.56	8.31	8.36	7.93	7.95	7.78	0.005
高锰酸盐指数/(mg/L) COD <sub>Mn</sub>	5.931	3.291	1.707	8.208	2.384	6.576	0.384
叶绿素 a/(mg/L) Chl-a	0.105	0.049	0.084	0.425	0.153	0.314	0.054
总磷/(mg/L) TP	0.848	0.495	1.244	0.449	0.306	0.373	0.092
活性磷/(mg/L) AP	0.492	0.272	0.594	0.008	0.042	0.014	0.011
总氮/(mg/L) TN	3.653	3.211	2.769	11.982	10.005	11.471	0.000
硝酸盐氮/(mg/L) NO <sub>3</sub> -N	0.467	1.432	0.499	2.609	4.975	4.031	0.015
亚硝酸盐/(mg/L) NO <sub>2</sub> -N	0.000 5	0.079 6	0.002 1	0.272 3	0.219 8	0.287 7	0.002
总氨氮/(mg/L) TAN	2.426	2.499	1.220	0.853	1.132	1.014	0.068

## 2.2 高通量测序数据及多样性指数

从凡纳滨对虾养殖池塘获取的水样、泥样及虾肠道样品共 18 个, 对其进行 16S *rRNA* 测序, 共获得 605 798 条有效序列, 进行 OTU 分类后获得 53 711 个 OTU (图 1)。总体而言, 无论是第 46 还是 86 天, 底泥微生物中 OTU 平均个数最高, 显著高于水样, 说明底泥样本中微生物数量最为丰富, 其中 86 d 时带病塘的底泥 OTU 个数最

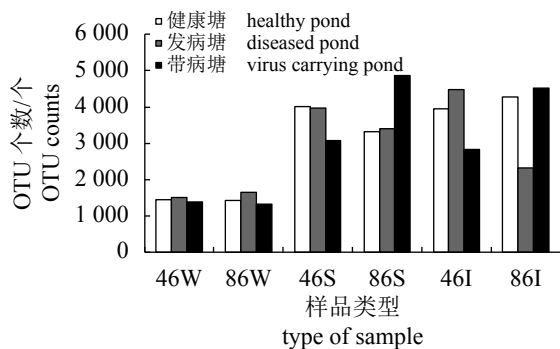


图 1 46 和 86 d 的凡纳滨对虾养殖塘水样、底泥和肠道微生物中的 OTU 个数统计

W. 水样, S. 底泥, I. 虾肠道; 下同

Fig. 1 The OTU counts of microorganisms in water, sediment and *L. vannamei* intestine samples at day 46 and day 86

W. water sample, S. sediment sample, I. intestine sample; the same below

多, 有 4 867 个。但随着虾龄的增长, 发病塘和带病塘的虾肠道 OTU 数发生了明显变化: 发病塘的虾肠道中 OTU 个数仅 2 313 个, 较 46 d 时 (4 474 个) 降低一半; 而带病塘虾肠道中 OTU 个数达 4 517 个, 较 46 d 时 (2 821 个) 增长了 60.12%。

比较凡纳滨对虾养殖至第 46 与 86 天时的水样、底泥和虾肠道微生物的 Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数 (表 3), 86 d 的水样、底泥和虾肠道样本 Shannon-Wiener 指数显著高于 46 d ( $P < 0.05$ )。无论是第 46 天还是第 86 天, 水样中的 Shannon-Wiener 指数均显著低于底泥和虾肠道 ( $P < 0.05$ )。其中最低值 5.99 出现在 46 d 时的发病塘水样中, 而最高值 10.79 出现在 86 d 时带病塘的虾肠道中。表明凡纳滨对虾的生长过程中, 肠道和养殖环境中的微生物多样性都在增加, 且底泥和虾肠道中的微生物群落多样性较水样更为丰富。

## 2.3 凡纳滨对虾养殖环境和肠道微生物群落组成及结构

对凡纳滨对虾不同养殖时期的水样、底泥及肠道样本的微生物进行分类汇总, 对应至门、纲、目、科和属 5 个水平 (表 4)。在所有样品中检出微生物 45 个门类, 分类至 125 纲, 268 目, 492 科以及 917 属, 从样品类型上来看, 水、底

表 3 凡纳滨对虾养殖塘水样、底泥及虾肠道微生物的 Shannon-Wiener 和 Simpson 指数

Tab. 3 Shannon-Wiener and Simpson indexes of microorganisms in water, sediment and *L. vannamei* intestine samples

		46 d			86 d		
		健康塘 healthy pond	发病塘 diseased pond	带病塘 virus carrying pond	健康塘 healthy pond	发病塘 diseased pond	带病塘 virus carrying pond
Shannon-Wiener指数 Shannon-Wiener index	水样 water	6.76	5.99	6.48	7.76	7.72	7.01
	底泥 sediment	10.30	10.18	9.72	9.18	9.88	10.62
	肠道 intestine	9.88	10.43	9.97	10.51	9.81	10.79
Simpson指数 Simpson index	水样 water	0.99	0.89	0.98	1.00	0.94	1.00
	底泥 sediment	1.00	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00
	肠道 intestine	0.99	1.00	1.00	0.97	0.96	1.00

表 4 凡纳滨对虾养殖水样、底泥及虾肠道中微生物群落的基本构成

Tab. 4 Basic structure of the microbial community in water, sediment and *L. vannamei* intestine samples

		门 phylum	纲 class	目 order	科 family	属 genus
水样 water		35	80	181	314	527
底泥 sediment		41	107	228	425	699
肠道 intestine		45	113	243	446	808

泥、虾肠道的微生物在 5 个分类水平中的数量均依次升高。

在凡纳滨对虾养殖水样、底泥和虾肠道微生物样品中共检测出 45 个门类, 3 类样品分别检测出 35、41 和 45 个门类 (图 2)。在不同的养殖塘中门类结构存在不同。水样、底泥和虾肠道三者的微生物群落结构之间具有一定的相关性。总体来看, 有 35 个门类共存于 3 类样品中; 有 6 个门类仅在底泥、凡纳滨对虾肠道中存在, 分别是嗜热丝菌门 (*Caldiserica*)、热脱硫杆菌门 (*Thermotogae*)、黏胶球形菌门 (*Lentisphaerae*)、*Cloacimonetes*、*Hydrogenedentes* 和 *GOUTA4*; 有 4 个门类仅在凡纳滨对虾肠道中存在, 分别是 *Candidate\_division\_OP3*、*OC31*、*Microgenomates* 和 *Aerophobetes*。

在纲水平上, 水样、底泥和肠道样品中共检出微生物纲类 125 个, 3 类样品中各检出 80、107、113 个纲, 其中有 70 个纲在 3 类样品中共存, 除此以外, 在水样和底泥、水样和虾肠道中分别有 4 个和 3 个相同纲, 底泥与虾肠道中检出 28 个相同的纲。共检出 268 个目, 水样、底泥和虾肠道中分别存在 181、228 和 243 个目,

共有目有 152 个, 另外, 水样和底泥样品中有 5 个目相同, 水样和虾肠道中有 14 个目相同, 底泥和虾肠道中有 61 个目共同存在。在科水平上, 共检出 492 个科, 3 类样品各检出 314、425 和 446 个科, 其中有 274 个科在水样、底泥和虾肠道中均能检出, 有 13 个科仅在水样中存在, 25 个科仅在底泥中检出, 虾肠道中则有 35 个单独存在的科, 其与底泥中共同存在的科有 118 个, 与水样中共同存在的科有 19 个。在属水平上, 检出 917 个属, 水样、底泥和虾肠道分别检出 527、699 和 808 个属, 共同存在的属有 420 个, 水样和底泥、水样和虾肠道、底泥和虾肠道中共有的属分别为 16、54 和 207 个。

水样、底泥和凡纳滨对虾肠道微生物分类至门水平的结构分布存在一定规律: 三者的优势门类为变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*), 其中变形菌门占绝对优势, 在水样、底泥和虾肠道中的平均相对丰度依次是 53.89%、51.93% 和 38.72% (图 3)。不同的样品类型在门分类水平上呈现差异, 变形菌门在水样和底泥中的相对丰度均显著高于虾肠道 ( $P < 0.05$ ), 芽单胞菌门

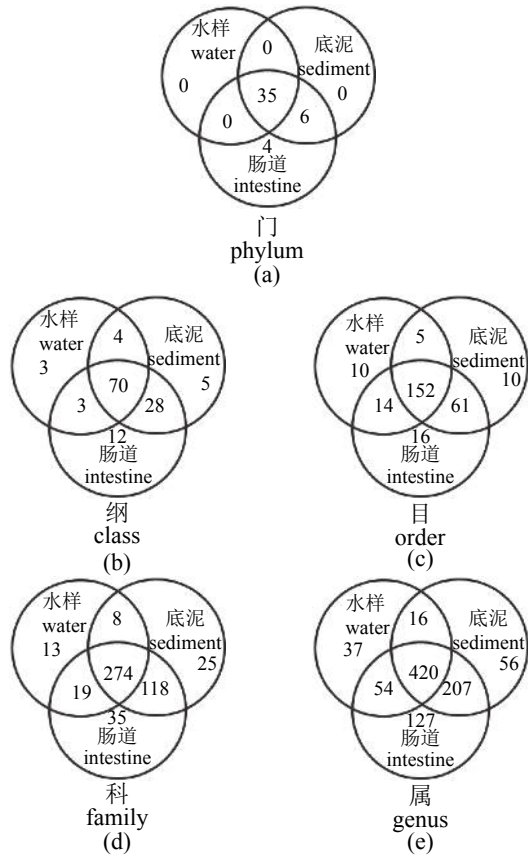


图 2 凡纳滨对虾养殖塘水样、底泥和虾肠道微生物在门(a)、纲(b)、目(c)、科(d)、属(e)水平检出数的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of microorganisms detected in water, sediment and intestine samples at the levels of phylum(a), class(b), order(c), family(d) and genus(e) in *L. vannamei* aquaculture ponds, respectively

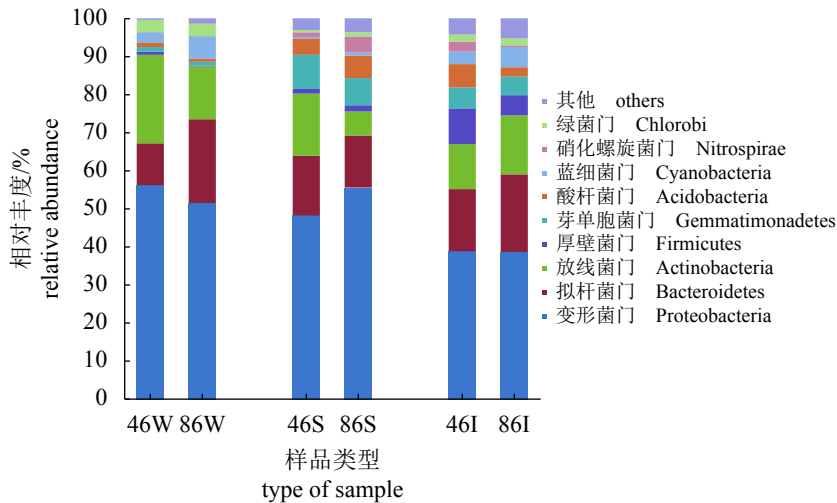


图 3 凡纳滨对虾 46 和 86 d 水样、底泥及虾肠道微生物优势门类相对丰度统计

Fig. 3 The relative abundance of dominant phyla in water, sediment and *L. vannamei* intestine samples at day 46 and day 86

(Gemmatimonadetes) 在水样中的相对丰度低于底泥和肠道，且差异极显著 ( $P < 0.05$ )，蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和绿菌门 (Chlorobi) 在底泥中相对丰度均小于 2%，显著低于水样及虾肠道 ( $P < 0.05$ )，酸杆菌门 (Acidobacteria) 和硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 在水样中相对丰度显著低于底泥 ( $P < 0.05$ )，此外，拟杆菌门和放线菌门的相对丰度在 3 类样品中无显著差异。微生物群落结构亦随虾龄增长出现变化，将 46 与 86 d 样品的微生物门类进行多元变量统计，得出差异性门类为放线菌门、绿菌门、丝状杆菌门 (Fibrobacteres)、浮霉状菌门 (Planctomycetes)，且这 4 个门的相对丰度均为 86 d 显著高于 46 d ( $P < 0.05$ )。在水样中，86 d 时的拟杆菌门相对丰度显著高于 46 d ( $P < 0.05$ )；在底泥样品中，变形菌门的相对丰度随虾的生长而增加 ( $P < 0.05$ )，但是放线菌门和芽单胞菌门的相对丰度变化相反，第 86 天较 46 天均显著下降 ( $P < 0.05$ )。另外，不同塘之间也存在一定的差异。在虾肠道中，带病塘的厚壁菌门 (Firmicutes) 在 46 d 时相对丰度为 21.44%，仅次于变形菌门，远高于厚壁菌门在水样和底泥样品中的平均丰度 (2.01%)，而至第 86 天，其丰度骤降至 4.59%；发病塘的虾肠道微生物中，酸杆菌门和硝化螺旋菌门变化与厚壁菌门类似，在 46 d 时相对丰度分别为 13.54% 和 6.63%，到 86 d 时，突降至 1.92% 和 0.24% (图 3)。

统计相对丰度在 1% 以上的微生物纲， $\alpha$  变

形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 $\beta$  变形菌纲 (Betaproteobacteria)、 $\gamma$  变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、 $\delta$  变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 和鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia) 等在水样、底泥和凡纳滨对虾肠道中的平均相对丰度较高 (图 4)。在水样中, 前三大优势纲为  $\alpha$  变形菌纲 (28.35%)、放线菌纲 (14.01%) 和  $\beta$  变形菌纲 (12.38%), 底泥中为  $\gamma$  变形菌纲 (15.50%)、 $\delta$  变形菌纲 (12.60%) 和  $\alpha$  变形菌纲 (12.40%), 而虾肠道中则是  $\alpha$  变形菌纲 (12.37%)、 $\beta$  变形菌纲 (9.14%) 和  $\gamma$  变形菌纲 (8.38%) 相对丰度稍高。微生物纲类在水样、底泥和凡纳滨对虾肠道中的相对丰度存在一定差异。芽单胞菌纲 (Gemmatimonadetes) 和 Thermoleophilia 在水样、虾肠道和底泥中的相对丰度依次显著增高; 水样中的  $\alpha$  变形菌纲和绿菌纲 (Chlorobia) 的相对丰度显著高于底泥和虾肠道, 纤维粘网菌 (Cytophagia) 则显著低于底泥和凡纳滨对虾肠道; 虾肠道中的芽孢杆菌纲 (Bacilli) (2.48%) 和拟杆菌纲 (Bacteroidia) (2.04%) 虽相对丰度不高, 但显著高于水样和底泥; 水样中的放线菌纲、酸微菌纲 (Acidimicrobiia) 和叶绿体 (Chloroplast) 相对丰度高于底泥,  $\beta$  变形菌纲相对丰度高于凡纳滨对虾肠道; 底泥中的硝化螺旋菌纲 (Nitrospira) 相对丰度高于水样, 叶绿体显著低于虾肠道。随虾龄增长, 微生物纲类也显示差别。微生物多元分析得出, 46 与 86 d 样品间的差异性纲类有放线菌纲、 $\delta$  变形菌纲、

丝状杆菌纲 (Fibrobacteria)、 $\gamma$  变形菌纲、OPB41 和疣微菌纲 (Verrucomicrobiae), 除了  $\gamma$  变形菌纲, 其他纲均随虾龄增长丰度显著增加。在水样中, 86 d 时的  $\alpha$  变形菌纲、放线菌纲、梭状芽胞杆菌纲 (Clostridia) 和 Thermoleophilia 较 46 d 时显著下降, 而黄杆菌纲 (Flavobacteriia) 则显著上升; 在底泥中, 芽单胞菌纲和 Thermoleophilia 相对丰度随时间显著降低。从 3 个不同塘的情况来看, 发病塘虾肠道的酸杆菌纲 (Acidobacteria) 出现了明显的下降, 46 d 时相对丰度为 13.54%, 远高于在健康塘和带病塘中的丰度水平, 86 d 时下降至 1.29%, 发病塘水样中的鞘脂杆菌纲以及虾肠道中的放线菌纲和酸微菌纲的相对丰度均随虾龄增大明显升高; 在健康塘中, 虾肠道中的鞘脂杆菌纲和酸微菌纲 86 d 分别占比 4.64% 和 3.02%, 较 46 d 时的 10.02% 和 7.59% 下降明显; 在带病塘中, 水样中的  $\gamma$  变形菌纲、黄杆菌纲和酸微菌纲, 凡纳滨对虾肠道中的叶绿体相对丰度均随时间的增加增长明显, 其中  $\gamma$  变形菌纲由 3.07% 升至 28.07%, 成为第 86 天时带病塘水样中的最优势纲类, 而底泥的放线菌纲和虾肠道的梭状芽胞杆菌纲则出现了明显的下降, 第 46 天时相对丰度分别为 17.46% 和 16.53%, 均远高于同期同类样品的健康塘和发病塘, 至第 86 天时降至 3.64% 和 2.34%, 与其余 2 个塘中的丰度水平相当 (图 4)。

在目、科、属分类水平上, 不同样品种类

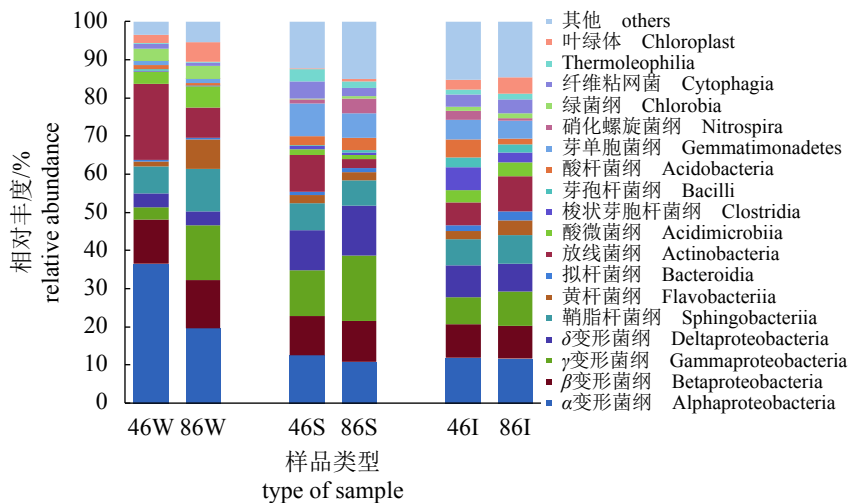


图 4 凡纳滨对虾 46 和 86 d 水样、底泥及虾肠道微生物优势纲类相对丰度统计 (>1%)

Fig. 4 The relative abundance of dominant classes in water, sediment and *L. vannamei* intestine samples at day 46 and day 86 (>1%)

的优势细菌的组成及丰度存在明显的不同。在水样、底泥和凡纳滨对虾肠道中共同的优势目(按 $\geq 5\%$ 计)为拟杆菌门鞘脂杆菌纲的鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales),除此以外,优势目(科、属)在不同样品中各异。在水样中,SAR11\_clade、 $\beta$ 变形菌纲的伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)、Frankiales和鞘脂杆菌目的平均相对丰度较高,但SAR11\_clade在各个塘中的丰度随虾龄变化显著,46 d时平均丰度为25.50%,但第86天时与健康塘和发病塘中均小于1%;另外,亦有个别菌目相对丰度较高,如86 d时的黄杆菌目(Flavobacteriales)和气单胞菌目(Aeromonadales)在带病塘中占比分别高达13.52%、20.35%。水样中的优势科为LD12\_freshwater\_group和鱼孢菌科(Sporichthyaceae),但平均相对丰度均随虾龄增大显著降低,由46 d时的25.5%、15.54%降至86 d时的3.73%和5.49%,LD12\_freshwater\_group在86 d的健康塘和带病塘中均降至1%以下(表5)。在底泥中,优势目则为黄单胞菌目(Xanthomonadales)、鞘脂杆菌目、Gemmatimonadales和枯球菌目(Myxococcales),且随虾龄增大无显著变化;除此以外,健康塘中的假单胞菌目(Pseudomonadales)在86 d时相对丰度为13.49%,是最占优势的目类,较46 d时增长约9倍,亦高于发病和带病塘(表6)。虾肠道中,仅鞘脂杆菌目相对丰度较高,为7.49%;除此外,梭状芽胞杆菌目(Clostridiales)在46 d时的带病塘中相对丰度是16.52%,显著高于86 d(表7)。在属的分类水平上,uncultured\_bacterium和uncultured在3种样品中均占一定优势,uncultured\_bacterium在水样中平均相对丰度为20.96%,但相对丰度在第46和86天存在显著差异( $P < 0.05$ ),分别为30.69%和11.24%;hgcI\_clade在水样中平均相对丰度为9.13%,显著高于底泥(0.07%)和虾肠道(1.75%);亦有少量属类的相对丰度随虾龄增长而突增,如致病气单胞菌属(*Aeromonas*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*),在86 d时的带病塘中相对丰度分别为20.33%和6.74%,亦均高于同期发病塘或健康塘的丰度水平,与之变化情况相似的还有健康塘底泥样品中的*Perlucidibaca*和硝化螺菌属(*Nitrospira*) (图5)。

### 3 讨论

肠道微生物及其菌群结构在水生动物生长

过程中具有重要作用,凡纳滨对虾的肠道微生物与其营养代谢、胃肠道发育及免疫防御有着密切联系,是维持对虾生长过程中肠道内环境稳态的重要因素<sup>[20]</sup>。有研究认为,对虾幼体阶段胃肠道发育不完全、免疫系统不完善,从水体中直接摄取食物,从而开始形成自身复杂的微生物区系,其微生物生态与外部水环境是密切相关的<sup>[21]</sup>。罗鹏等<sup>[22]</sup>发现,海湾沿岸水和淡水养殖环境下的凡纳滨对虾,肠道中出现的细菌绝大多数可以从水环境中找到来源,对长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)<sup>[23]</sup>和脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)<sup>[24]</sup>的肠道菌群研究结果类似,认为虾肠道中微生物是由水体中演替而来。但夏海峰等<sup>[12]</sup>研究刺参肠道和养殖环境底泥细菌时发现,随季节变化二者种群数量变化趋同,表明其菌系具有内在联系。本研究结果显示,在水样、底泥和凡纳滨对虾肠道中有35个门、70个纲、152个目、274个科以及420个属在其中均能检测到,表明凡纳滨对虾的养殖环境与虾肠道微生物之间存在密切的联系。而从各个分类水平上的分布可见底泥与虾肠道之间的共有微生物最多,水样分别与底泥和虾肠道之间的共有微生物较少。该结果在一定程度上暗示了在本研究中,底泥与虾肠道微生物菌群结构的密切关系。

从微生物群落的多样性角度亦可见该规律。微生物群落的多样性在维持生态功能方面有重要的作用,多样性低或能表明微生物群落功能稳定性差,生物患病风险增大。黄雪敏等<sup>[9]</sup>研究表明,养殖水样中更高的alpha多样性有利于水体环境稳定和虾幼体的健康,反之则有可能造成幼体发病。杜世聪等<sup>[25]</sup>同样发现,凡纳滨对虾发病前的病害趋向塘的浮游细菌,表现出了较健康塘显著低的Shannon指数,并认为Shannon指数下降可作为对虾健康出现分化的标志。本研究从Shannon-Wiener指数和Simpson多样性指数结果显示,水样、底泥和凡纳滨对虾肠道中微生物的多样性随虾龄同增长,且水样中的多样性指数均明显低于底泥和虾肠道,该结果进一步说明凡纳滨对虾肠道微生物与养殖水样和底泥关系密切,而肠道菌群的组成可能较多来源于底泥,这与孙振丽等<sup>[26]</sup>研究凡纳滨对虾的结论相符。原本健康的虾在养殖后期患病,其



表 5 凡纳滨对虾养殖池塘水样中主要菌群汇总 (平均相对丰度&gt;3%)

	46 d			86 d			%
	H	D	C	H	D	C	
变形菌门 Proteobacteria	54.33	58.92	55.54	52.05	51.85	50.66	
α变形菌纲 Alphaproteobacteria	32.35	41.34	37.29	19.85	27.34	11.96	
红杆菌目 Rhodobacterales	4.00	2.82	4.33	6.13	2.28	3.30	
红杆菌科 Rhodobacteraceae	4.00	2.82	4.33	6.13	2.28	3.30	
β变形菌纲 Betaproteobacteria	12.23	12.79	10.58	16.33	14.04	8.33	
伯克霍尔德氏菌目 Burkholderiales	9.92	11.40	8.38	15.04	12.11	7.37	
丛毛单胞菌科 Comamonadaceae	5.68	7.51	4.89	12.41	6.45	3.84	
γ变形菌纲 Gammaproteobacteria	3.30	2.87	3.07	9.51	5.71	28.07	
气单胞菌目 Aeromonadales	0.03	0.02	0.03	0.50	0.06	20.35	
气单胞菌科 Aeromonadaceae	0.03	0.02	0.03	0.50	0.06	20.34	
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	0.02	0.02	0.03	0.50	0.06	20.33	
δ变形菌纲 Deltaproteobacteria	5.71	1.51	4.10	5.52	3.72	1.73	
拟杆菌门 Bacteroidetes	10.81	7.81	14.10	20.80	20.52	24.89	
鞘脂杆菌纲 Sphingobacteriia	6.78	4.24	10.50	12.19	12.31	9.41	
鞘脂杆菌目 Sphingobacteriales	6.78	4.24	10.50	12.19	12.31	9.41	
腐败螺旋菌科 Saprospiraceae	5.04	0.56	8.04	9.65	1.35	4.19	
黄杆菌纲 Bacilli	1.35	1.29	1.52	5.37	4.49	13.52	
黄杆菌目 Flavobacteriales	1.35	1.29	1.52	5.37	4.49	13.52	
放线菌门 Actinobacteria	22.47	28.15	19.40	9.72	14.53	16.90	
放线菌纲 Actinobacteria	19.14	23.78	17.56	4.62	9.58	9.38	
鱼孢菌科 Sporichthyaceae	16.82	14.04	15.77	3.36	6.44	6.66	
酸微菌纲 Acidimicrobiia	3.26	4.28	1.77	4.97	4.74	7.29	
醋微菌目 Acidimicrobiales	3.26	4.28	1.77	4.97	4.74	7.29	
醋微菌科 Acidimicrobiaceae	3.20	4.10	1.60	4.49	4.39	6.68	
绿菌门 Chlorobi	5.90	0.99	2.79	3.67	2.94	3.44	
绿菌纲 Chlorobia	5.89	0.98	2.78	3.66	2.93	3.43	
绿菌目 Chlorobiales	5.89	0.98	2.78	3.66	2.93	3.43	
蓝细菌门 Cyanobacteria	2.27	1.96	3.83	9.02	6.03	2.36	
叶绿体 Chloroplast	1.97	1.81	3.16	7.84	5.46	2.16	
Frankiales	16.83	14.09	15.77	3.37	6.46	6.66	
SAR11_clade	19.75	32.70	24.05	0.28	10.39	0.51	
LD12_freshwater_group	19.75	32.70	24.05	0.28	10.39	0.51	
OPB56	5.89	0.97	2.78	3.65	2.93	3.43	
uncultured	3.61	2.94	5.14	7.56	11.80	2.35	
uncultured_bacterium	27.46	34.77	29.82	11.22	15.42	7.07	
<i>Ambiguous_taxa</i>	5.85	3.25	5.56	2.35	4.50	2.65	
hgcI_clade	13.59	11.85	13.03	3.31	6.34	6.63	
CL500_29_marine_group	2.53	3.66	1.21	3.28	3.38	5.14	

注: H. 健康塘, D. 发病塘, C. 带病塘; 下同

Notes: H. healthy pond, D. diseased pond, C. virus carrying pond; the same below

表 6 凡纳滨对虾养殖池塘底泥中主要菌群汇总 (平均相对丰度&gt;3%)

	46 d			86 d		
	H	D	C	H	D	C
变形菌门 Proteobacteria	48.51	50.10	46.27	56.97	55.62	54.10
α变形菌纲 Alphaproteobacteria	10.64	12.63	16.34	8.54	15.94	10.31
鞘氨醇单胞菌目 Sphingomonadales	1.73	4.32	5.07	3.22	5.37	2.71
红螺菌目 Rhodospirillales	4.58	3.33	3.87	2.61	5.31	2.81
β变形菌纲 Betaproteobacteria	12.11	12.76	7.68	12.44	10.51	11.39
伯克霍尔德氏菌目 Burkholderiales	2.83	4.56	2.63	3.21	4.27	3.30
亚硝化单胞菌目 Nitrosomonadales	5.24	4.50	2.85	3.96	3.20	4.02
亚硝化单胞菌科 Nitrosomonadaceae	5.12	4.46	2.81	3.88	3.19	3.21
γ变形菌纲 Gammaproteobacteria	12.20	14.98	11.44	22.27	16.83	15.28
假单胞菌目 Pseudomonadales	1.34	0.81	0.68	13.49	4.09	0.90
黄单胞菌目 Xanthomonadales	8.38	11.90	8.16	4.80	8.67	10.33
黄单胞菌科 Xanthomonadaceae	2.86	6.07	4.64	2.94	4.67	3.86
δ变形菌纲 Deltaproteobacteria	13.34	9.54	10.57	13.43	12.05	16.67
枯球菌目 Myxococcales	5.20	4.20	6.93	3.78	5.99	4.60
拟杆菌门 Bacteroidetes	14.06	18.62	14.33	8.93	18.25	13.97
鞘脂杆菌纲 Sphingobacteriia	6.61	8.41	6.88	2.75	11.57	6.52
鞘脂杆菌目 Sphingobacteriales	6.61	8.41	6.88	2.75	11.57	6.52
放线菌门 Actinobacteria	13.77	12.01	23.31	5.09	6.21	7.73
放线菌纲 Actinobacteria	6.87	6.22	17.46	1.36	2.67	3.64
酸杆菌门 Acidobacteria	5.53	4.14	2.84	7.32	4.36	6.19
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	9.70	8.72	8.45	7.66	7.13	6.16
芽单胞菌纲 Gemmatimonadetes	9.70	8.72	8.45	7.66	7.13	6.16
纤维粘网菌 Cytophagia	4.01	4.44	5.61	1.28	3.70	2.22
Cytophagales	3.91	4.17	4.88	1.23	3.67	2.14
Gemmatimonadales	7.47	6.34	4.94	7.00	6.20	4.64
Gemmatimonadaceae	7.47	6.34	4.94	7.00	6.20	4.64
Chitinophagaceae	2.36	5.94	4.55	1.80	8.31	2.75
Ambiguous_taxa	3.96	3.64	2.99	5.81	4.58	3.91
uncultured	23.96	22.70	15.46	16.65	20.21	24.35
uncultured_bacterium	8.54	6.53	7.50	7.93	7.34	6.93
Ambiguous_taxa	5.62	5.00	3.93	6.58	5.09	6.52

肠道微生物多样性指数确有降低,且低于健康塘和带病塘。该结果与 Xiong 等<sup>[6]</sup>和吴金凤等<sup>[10]</sup>

的结果一致,发病塘对虾的肠道细菌多样性低于健康塘对虾,表明微生物的多样性在养殖类

表 7 凡纳滨对虾肠道中主要菌群汇总 (平均相对丰度>3%)  
 Tab. 7 Summary of the main flora in *L. vannamei* intestine samples (mean relative abundance>3%) %

	46 d			86 d		
	H	D	C	H	D	C
变形菌门 Proteobacteria	36.83	40.48	39.04	37.23	39.37	39.36
α变形菌纲 Alphaproteobacteria	14.33	8.73	14.50	13.26	11.88	11.52
鞘氨醇单胞菌目 Sphingomonadales	2.98	1.40	6.51	5.06	2.90	3.29
β变形菌纲 Betaproteobacteria	9.68	11.52	6.83	7.50	10.07	9.24
伯克霍尔德氏菌目 Burkholderiales	6.80	1.45	2.83	3.84	7.30	5.12
γ变形菌纲 Gammaproteobacteria	7.60	6.25	8.63	9.44	8.64	9.73
δ变形菌纲 Deltaproteobacteria	4.70	13.56	8.62	6.65	8.00	8.17
拟杆菌门 Bacteroidetes	18.00	15.19	16.21	17.01	22.12	22.17
鞘脂杆菌纲 Sphingobacteriia	10.02	4.19	7.20	4.64	9.92	8.97
鞘脂杆菌目 Sphingobacteriales	10.02	4.19	7.20	4.64	9.92	8.97
黄杆菌纲 Flavobacteriia	2.70	2.05	2.54	4.46	4.38	3.56
黄杆菌目 Flavobacteriales	2.70	2.05	2.54	4.46	4.38	3.56
放线菌门 Actinobacteria	21.73	5.08	8.13	17.92	16.64	12.06
放线菌纲 Actinobacteria	12.54	2.07	4.57	10.43	10.12	7.79
酸微菌纲 Acidimicrobiia	7.59	0.97	1.38	3.02	5.71	2.94
醋微菌目 Acidimicrobiales	7.59	0.97	1.38	3.02	5.71	2.94
厚壁菌门 Firmicutes	4.79	2.01	21.44	6.67	4.47	4.59
梭状芽胞杆菌纲 Clostridia	1.78	0.94	16.53	3.90	1.73	2.34
梭状芽胞杆菌目 Clostridiales	1.78	0.93	16.52	3.90	1.71	2.33
酸杆菌门 Acidobacteria	1.69	13.54	3.71	2.05	1.92	3.00
酸杆菌纲 Acidobacteria	1.25	11.44	1.96	1.45	1.29	2.23
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	3.57	7.45	5.41	7.29	2.75	4.68
芽单胞菌纲 Gemmatimonadetes	3.57	7.45	5.41	7.29	2.75	4.68
蓝细菌门 Cyanobacteria	7.63	0.84	1.01	4.30	6.03	5.53
纤维粘网菌 Cytophagia	2.61	4.19	3.52	3.18	3.86	4.38
叶绿体 Chloroplast	6.57	0.74	0.85	3.66	4.81	4.90
Cytophagales	2.39	3.94	3.20	3.10	3.48	4.12
Gemmatimonadales	2.07	4.57	3.47	4.15	1.42	2.45
Gemmatimonadaceae	2.07	4.57	3.47	4.15	1.42	2.45
Chitinophagaceae	4.25	2.02	4.83	2.17	2.70	3.07
uncultured_bacterium	2.04	6.78	1.99	3.69	1.51	2.83
uncultured	6.70	19.31	12.47	7.47	6.90	10.77
uncultured_bacterium	5.07	11.98	4.68	7.07	5.77	6.79
Ambiguous_taxa	2.83	6.16	3.77	3.12	3.42	3.74

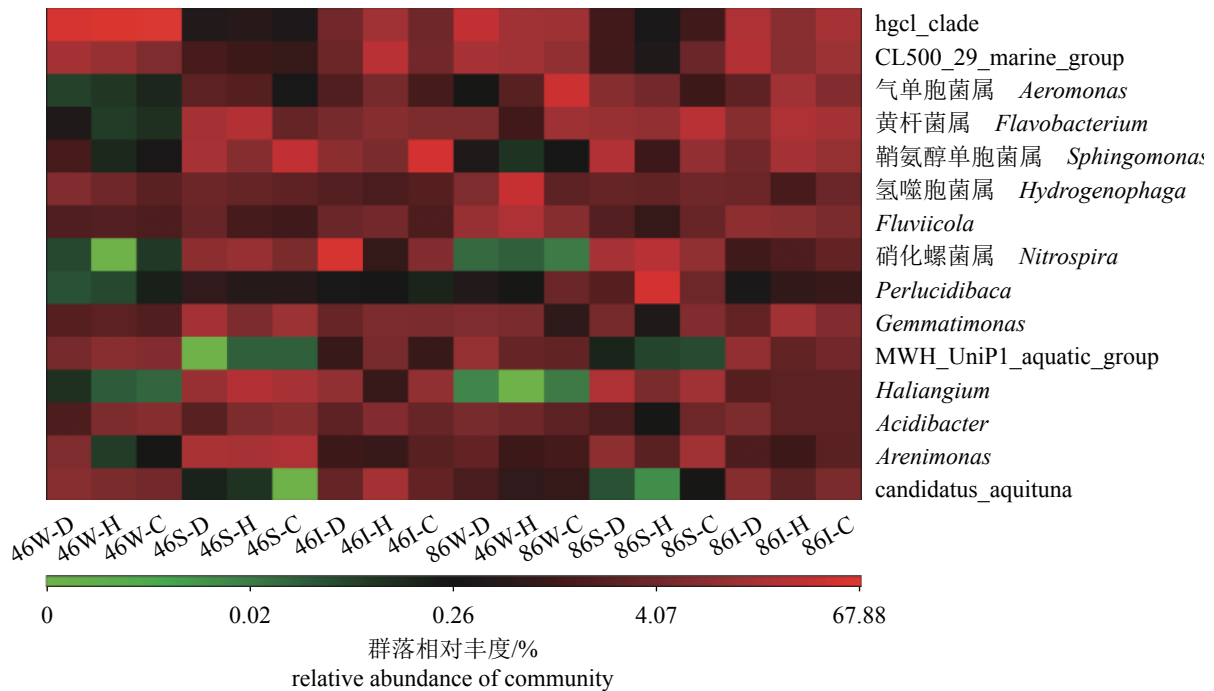


图5 各凡纳滨对虾养殖塘水样、底泥和虾肠道中细菌属相对丰度热图(前15)

W.水样, S.底泥, I.虾肠道, D.发病塘, H.健康塘, C.带病塘

Fig. 5 Heatmap of bacterial genera relative abundance of water, sediment and *L. vannamei* intestine in each aquaculture pond (Top15)

W. water sample, S. sediment sample, I. intestine sample, D. diseased pond, H. healthy pond, C. virus carrying pond

动物中有重要的调节作用, 肠道微生物多样性更是被认为是代表宿主健康及代谢能力的生物指标<sup>[27]</sup>。但除此以外, 微生物的群落结构组成在显示肠道菌群与环境菌群的关系上更为直接。

凡纳滨对虾肠道和养殖环境中菌群的结构和组成, 受不同的环境、不同的养殖条件以及对虾的生长状况等各方面的影响或有不同<sup>[28]</sup>, 所以菌群结构在正常情况下处于动态平衡中<sup>[29]</sup>。Moss等<sup>[30]</sup>将2批凡纳滨对虾养殖于不同的水环境一段时间后, 其肠道菌群在多样性及数量上均产生差异, Oxley等<sup>[31]</sup>发现野生和养殖的墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)成虾的肠道微生物群落在组成上高度相似。这些研究结果共同说明了外界环境会影响对虾肠道的菌群结构, 但是当对虾养殖到一定程度, 肠道细菌区系会相对稳定及成熟, 不易受环境影响<sup>[22]</sup>。本实验结果显示, 伴随凡纳滨对虾的生长, 养殖环境和虾肠道的群落结构发生了改变, 但其中的优势群落相对固定: 在养殖水样、底泥和虾肠道中, 优势门类均为变形菌门、拟杆菌门和放线菌门, 相对总丰度均占比70%以上, 其中变形菌门在

3类样品中均占绝对优势, 但其相对丰度在虾肠道中(38.72%)要低于水样(53.89%)和底泥(51.95%); 除此以外, 虾肠道中厚壁菌门亦占一定优势(7.33%), 芽单胞菌门不仅是底泥中的优势菌群之一, 同时也在虾肠道中占一定优势。

孙振丽等<sup>[26]</sup>研究结果显示变形菌门(34.80%)、一种未分类的细菌门(25.74%)和厚壁菌门(18.89%)是凡纳滨对虾肠道中的优势菌门; 郁维娜等<sup>[28]</sup>研究发现, 健康或患病凡纳滨对虾肠道中主要菌群均为变形菌门(51.2%)和放线菌门(27.2%); 董学兴等<sup>[32]</sup>研究的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)肠道中的核心菌群是变形菌门和厚壁菌门; Tzeng等<sup>[33]</sup>研究不同环境下生长的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)肠道发现主要菌群分别为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。以上与本研究结论相似, 变形菌门和放线菌门在虾肠道中为主要菌群, 此结论亦印证了Harris<sup>[34]</sup>的水生动物存在固有的肠道微生物群落的观点。拟杆菌门在3类样品中均占较高比例, 在水样中占比更是随养殖时间延长而显著增高。拟杆菌门分类下的细菌与DNA、蛋白质及脂类等有机

物的转换之间有密切联系, 有机物质的吸收与利用是水环境中碳循环的重要组成部分<sup>[35]</sup>。而造成拟杆菌门在水样中增加的原因可能是在养殖过程中, 没有被虾完全消化的饲料会不断随粪便排入水体, 造成水样中拟杆菌门的堆积, 而未及时分解的便会沉积, 同时造成池底拟杆菌群含量的增加<sup>[36]</sup>, 在整个养殖过程中一直保持健康状态的池塘的底泥中拟杆菌门在 86 d 时确有大幅降低, 在一定程度上反映出健康塘的凡纳滨对虾对于饲料具有较强的消化和吸收能力。本研究中的厚壁菌门的差异性主要体现在梭状芽孢杆菌目上, 在 46 d 时带病塘的虾肠道中相对丰度高达 16.52%, 至 86 d 时急剧下降至 2.33%, 此时带病塘未出现死虾, 但发病塘出现了死虾, 2 个塘均检测出了携带病毒, 但发病塘虾肠道中的梭状芽孢杆菌随虾龄增长未发生显著的丰度变化, 始终维持在较低水平。吴金凤等<sup>[10]</sup>研究发现发病对虾肠道中的梭状芽孢杆菌丰度显著高于健康对虾肠道, 梭状芽孢杆菌因其强烈的外毒素能造成细胞严重的坏死性和水肿型肝损伤<sup>[37]</sup>, 当其丰度增加时, 可能会对凡纳滨对虾产生毒害作用, 进而导致疾病的发生<sup>[10]</sup>。带病塘未出现明显的患病情况原因或许与梭状芽孢杆菌丰度较低有关。除此以外, 酸杆菌门和硝化螺旋菌门在 46 d 的发病塘的虾肠道中相对丰度显著高于其他 2 个塘, 且在 86 d 时显著降低。酸杆菌门和硝化螺旋菌门通常在对土壤微生物中的研究中占据优势地位, 酸杆菌门是基于分子生物学研究划分的新细菌类群, 是一种嗜酸菌, 且多为不可培养的细菌<sup>[38]</sup>, 在凡纳滨对虾肠道中也有检出, 但占比极小<sup>[39]</sup>, 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 肠道中也检出丰度较小的硝化螺旋菌门<sup>[40]</sup>。有研究表明硝化螺旋菌纲为有益菌, 能减少污水中铵离子的含量, 能维持氨氮、硝酸盐和亚硝酸盐等氮循环体系<sup>[41]</sup>。对于这 2 个门类在虾肠道中的研究较少, 推测其含量在发病塘虾肠道中的骤减, 可能暗示了水体和底泥环境的变化, 进一步影响了对虾的健康。

在纲水平上, 水样、底泥和虾肠道中共有的优势纲为  $\alpha$  变形菌纲、 $\beta$  变形菌纲以及放线菌纲, 除此以外, 虾肠道与水样共有的优势纲为鞘脂杆菌纲, 虾肠道与底泥共有的优势纲则有  $\delta$  变形菌纲、 $\gamma$  变形菌纲以及芽单胞菌纲。研究发

现, 处于不同发育阶段的斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[42]</sup>和罗氏沼虾<sup>[43]</sup>的肠道优势菌均为  $\gamma$  变形菌纲, 亦有研究显示  $\gamma$  变形菌在营养物质含量高的水域普遍存在, 多样性及数量都很大<sup>[44]</sup>, 本研究中  $\gamma$  变形菌门在水样中相对丰度为 8.76%, 也显示了本研究中凡纳滨对虾养殖水样中营养物质较丰富。在科水平上的优势菌群各不相同, 水样中主要由红杆菌科、丛毛单胞菌科、气单胞菌科、醋微菌科、腐败螺旋菌科以及 LD12\_freshwater\_group 组成, 底泥中则为黄单胞菌科和亚硝化单胞菌科。虽然有 420 个属在水样、底泥和虾肠道样品中均能检测出, 但除了 uncultured\_bacterium 在 3 种样品中占比较高外, 其他属的相对丰度在各类样品中各不相同, 所以微生物在“属”层面上没有明显的重叠, 该结论与孙振丽等<sup>[26]</sup>的结论一致。除此以外, 在水样、底泥和虾肠道中检测出了 4 种致病菌: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、气单胞菌属、弧菌属 (*Vibrio*) 和黄杆菌属, 3 种益生菌: 蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus Cohn*)<sup>[26]</sup>, 但其含量均较低, 仅气单胞菌属在 86 d 带病塘中相对丰度为 20.33%。弧菌在水生动物养殖环境中普遍存在, 是虾幼苗期主要的致病菌, 能导致虾死亡<sup>[45]</sup>。致病菌增多会导致疾病的发生, 研究发现在感染对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 的凡纳滨对虾肠道中, 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、弧菌属、气单胞菌属等菌群数量显著高于健康对虾<sup>[46]</sup>。带病塘虽未发病, 但检测出了虹彩病毒, 同时气单胞菌属的相对丰度显著增高, 二者之间或许存在一定的联系。目前对于感染虹彩病毒的凡纳滨对虾肠道菌群结构的研究较少, 但虾血细胞虹彩病毒已被证实能感染凡纳滨对虾、日本沼虾、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、克氏原螯虾和脊尾白虾, 并且发现通过投喂或反向灌肠该病毒对凡纳滨对虾的致死率高达 100%<sup>[47]</sup>, 是对虾养殖的一个重大威胁。致病菌的及时发现对于养殖有重要意义, 已有相关研究表明, 在饲料中添加芽孢杆菌胞外蛋白和胞内多糖粗提物在一定程度上能影响凡纳滨对虾机体能量代谢和肠道消化酶活性, 有助于提高能量代谢水平, 以及幼虾抵抗白斑综合征病毒的能力<sup>[48]</sup>。

除此以外, 检测和调控对虾养殖水体的水

质因子已成为养殖户的共识。在本研究中, 养殖后期 pH 显著降低, 亚硝氮和总氮含量显著升高, 与其他水生生物养殖水体的水质变化趋势相同<sup>[49]</sup>。亚硝氮是硝化过程的中间产物, 常在养殖过程中出现亚硝氮的积累, 研究发现亚硝氮会抑制虾类的生长和变态发育<sup>[50]</sup>, 通常在以换水为主的养殖模式中, 养殖 30 d 左右出现, 而后迅速升高并居高不下<sup>[51]</sup>, 过高的亚硝氮有时会引起对虾大量死亡。在本实验中, 亚硝氮虽然含量增高, 但未显著超过安全浓度 (0.24 mg/L), 表明凡纳滨对虾生存的水域环境质量在相对安全的范围之内。对于调控水质的研究近年来比较丰富, 如去除悬浮物对提高对虾的产量和饲料效率有明显的效果, 同时能够显著降低水体中亚硝氮、硝酸盐氮、磷酸盐等浓度, 提高水体溶解度<sup>[52]</sup>; 以及有研究表明将养殖密度控制在 80~610 尾/m<sup>3</sup>, 硝化型生物絮团能控制非离子氨和亚硝氮含量保持在安全水平, 极大保证了养殖存活率<sup>[53]</sup>。

综上所述, 凡纳滨对虾肠道与养殖水样、底泥中的微生物结构存在密切联系, 其中虾肠道和底泥中菌群结构较水样中更为丰富, 3 类样品拥有相对固定的优势菌群及共有菌群, 同时也发现了三者间的差异物种, 对于理解这三者之间存在的关联有了更进一步的基础。在检测中还发现了少量致病菌, 虽其未被证明在此次研究中造成疾病, 但在养殖过程中关注致病菌的存在、投入益生菌等措施对于防治疾病、健康养殖具有积极的意义。

### 参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2018[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Terminal, China Society of Fisheries. China Fishery Statistics Yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2018(in Chinese).
- [2] 王亭芳. 南美白对虾养殖水体中微生物多样性分析 [D]. 上海: 华东师范大学, 2012.
- Wang T F. Analysis of microbial diversity in aquaculture water of *Penaeus vannamei*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2012 (in Chinese).
- [3] 张家松, 段亚飞, 张真真, 等. 对虾肠道微生物菌群的研究进展[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 114-119.
- Zhang J S, Duan Y F, Zhang Z Z, et al. Research progress of intestinal microbial flora in shrimp[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 114-119(in Chinese).
- [4] 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.
- [5] 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.
- [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] 杨莺莺, 李卓佳, 林亮, 等. 人工饲料饲养的对虾肠道菌群和水体细菌区系的研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(3): 53-56.
- Yang Y Y, Li Z J, Lin L, et al. Analyses on intestinal flora of cultured shrimp and water microbial flora[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(3): 53-56(in Chinese).
- [8] 王元, 周俊芳, 韦信贤, 等. 海水和淡水养殖凡纳滨对虾肠道和鳃的菌群结构分析[J]. 自然科学版, 2018, 44(2): 198-203.
- Wang Y, Zhou J F, Wei X X, et al. Microbial community structure analysis of intestine and gill of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2018, 44(2): 198-203(in Chinese).
- [9] 黄雪敏, 温崇庆, 梁华芳, 等. 健康和发病凡纳滨对虾糠虾期育苗池水体的菌群结构比较[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(4): 27-34.
- Huang X M, Wen C Q, Liang H F, et al. Comparison of bacterial community structure in larval rearing water between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei* mysis[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(4): 27-34(in Chinese).
- [10] 吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康

- 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).
- [11] 秦伟, 周鑫, 周文全, 等. 精养克氏原螯虾池塘底泥微生物群落特征分析[J]. 南方农业学报, 2015, 46(12): 2209-2216.
- Qin W, Zhou X, Zhou W Q, *et al.* Microflora characteristics of sediment from *Procambarus clarkii* intensive culture pond[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(12): 2209-2216(in Chinese).
- [12] 夏海峰, 杜宗军, 陈冠军. 刺参肠道及养殖池塘底泥微生物多样性的比较研究[J]. 海洋湖沼通报, 2015(4): 105-110.
- Xia H F, Du Z J, Chen G J. A comparative study of microbial diversity in the intestine of sea cucumber and breeding pond sediment[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2015(4): 105-110(in Chinese).
- [13] 陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素a测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨[J]. 湖泊科学, 2006, 18(5): 550-552.
- Chen Y W, Chen K N, Hu Y H. Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using hot-ethanol extraction method[J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(5): 550-552(in Chinese).
- [14] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [15] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [16] 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.
- [17] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [18] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al.* VSEARCH: A versatile open source tool for meta genomics[J]. PeerJ, 2016, 4: e2584.
- [19] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148): 688.
- [20] 樊英, 王晓璐, 李乐, 等. 基于高通量测序的不同养殖系统下凡纳滨对虾肠道和水体中微生物的多样性[J]. 广西科学院学报, 2017, 33(4): 261-267, 273.
- Fan Y, Wang X L, Li L, *et al.* Analysis of aquaculture-water and gut from *Fenneropenaeus chinensis* in different systems on bacterial diversity based on high-throughput sequencing technology[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2017, 33(4): 261-267, 273(in Chinese).
- [21] 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).
- [22] 罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的PCR-DGGE分析[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 49-53.
- Luo P, Hu C Q, Xie Z Y, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(2): 49-53(in Chinese).
- [23] 王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及虾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).
- [24] 沈辉, 万夕和, 何培民, 等. 脊尾白虾肠道微生物菌群结构[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1922-1928.
- Shen H, Wan X H, He P M, *et al.* Bacterial community structure in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1922-1928(in Chinese).
- [25] 杜世聪, 黄雷, 杨坤杰, 等. 凡纳滨对虾健康状态分化前后养殖水体浮游细菌群落的比较[J]. 生态学杂志, 2019, 38(8): 2456-2465.
- Du S C, Huang L, Yang K J, *et al.* The bacterio plankton variation of *Litopenaeus vannamei* culture before and after the disease emergence[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(8): 2456-2465(in Chinese).
- [26] 孙振丽, 宣引明, 张皓, 等. 南美白对虾养殖环境及其

- 肠道细菌多样性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 594-605.
- Sun Z L, Xuan Y M, Zhang H, *et al.* Bacterial diversity in the *Penaeus vannamei* Boone intestine and aquaculture environment[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 594-605(in Chinese).
- [27] Jena P K, Sheng L L, Nagar N, *et al.* The effect of synbiotics *Bifidobacterium infantis* and milk oligosaccharides on shaping gut microbiota community structure and NASH treatment[J]. *Data in Brief*, 2018, 19: 1025-1029.
- [28] 郁维娜, 戴文芳, 陶震, 等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 399-409.
- Yu W N, Dai W F, Tao Z, *et al.* Characterizing the compositional and functional structures of intestinal microflora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(3): 399-409(in Chinese).
- [29] 王咏梅, 陈冰, 曹俊明, 等. 桑叶黄酮对凡纳滨对虾肠道黏膜形态和肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2000, 31(2): 255-263.
- Wang Y M, Chen B, Cao J M, *et al.* Effects of mulberry leaf flavonoids on intestinal mucosal morphology and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2000, 31(2): 255-263(in Chinese).
- [30] Moss S M, Leamaster B R, Sweeney J N. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2000, 31(2): 255-263.
- [31] 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.
- [32] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(4): 501-510.
- Dong X X, Lü L L, Zhao W H, *et al.* Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(4): 501-510(in Chinese).
- [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] Harris J M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis[J]. *Microbial Ecology*, 1993, 25(3): 195-231.
- [35] Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, *et al.* Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities in habiting a marine recirculating aquaculture system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(6): 1935-1946.
- [36] Rosselló-Mora, Thamdrup B, Schäfer H, *et al.* The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(2): 237-248.
- [37] García A, Ayuso D, Benítez J M, *et al.* *Clostridium novyi* infection causing sow mortality in an Iberian pig herd raised in an outdoor rearing system in Spain[J]. *Journal of Swine Health and Production*, 2009, 17(5): 264-268.
- [38] 江玉梅, 张晨, 黄小兰, 等. 重金属污染对鄱阳湖底泥微生物群落结构的影响[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(11): 3475-3486.
- Jiang Y M, Zhang C, Huang X L, *et al.* Effect of heavy metals in the sediment of Poyang Lake estuary on microbial communities structure base on Mi-seq sequencing[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(11): 3475-3486(in Chinese).
- [39] 裴鹏兵, 吴洁琼, 梁宏豪, 等. 生物净水栅对凡纳滨对虾肠道菌群组成的影响[J]. 水产科学, 2018, 37(3): 301-308.
- Pei P B, Wu J Q, Liang H H, *et al.* Effects of biological water purification grid on intestinal flora composition of pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 301-308(in Chinese).
- [40] 王贤丰, 赵艳飞, 宋志飞, 等. 应用高通量测序技术分析拟穴青蟹肠道及其养殖环境菌群结构[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1245-1253.
- Wang X F, Zhao Y F, Song Z F, *et al.* Application of high-throughput sequencing techniques for analyzing



- bacterial communities in pond-raised mud crab (*Scylla paramamosain*) intestine and its aquaculture environment[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1245-1253(in Chinese).
- [41] 房昉昊, 彭剑峰, 宋永会, 等. 高通量测序法表征潜流人工湿地中不同植物根际细菌群落特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(3): 911-918.
- Fang Y H, Peng J F, Song Y H, *et al.* High throughput sequencing analysis of microbial communities in different plant rhizosphere in subsurface-flow constructed wetland[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(3): 911-918(in Chinese).
- [42] 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): e60802.
- [43] Mente E, Gannon A T, Nikou E, *et al.* Gut microbial communities associated with the molting stages of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Aquaculture*, 2016, 463: 181-188.
- [44] Payne MS, Hall MR, Bannister R, *et al.* Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster (*Panulirus ornatus*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 80-90.
- [45] Zhou J F, Fang W H, Yang X L, *et al.* A non luminescent and highly virulent *Vibrio harvey* strain is associated with "Bacterial White Tail Disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e29961.
- [46] 李继秋. 对虾微生态制剂的研究和应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004: 24-82.
- Li J Q. Studies on the effects of microbial ecological agents for shrimp[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004: 24-82 (in Chinese).
- [47] 陈彤. 十足目虹彩病毒 1(DIV1) 的易感宿主调查 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Chen X. Susceptible host survey of decapod iridescent virus1 (DIV1)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [48] 单洪伟, 于鹏, 刘宽, 等. 饲料中添加芽孢杆菌组分对凡纳滨对虾幼虾生长、能量代谢和抗WSSV能力的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2020, 50(1): 30-38.
- Shan H W, Yu P, Liu K, *et al.* Effects of different components of *Bacillus* sp. on growth, energy metabolism and WSSV resistance of *Litopenaeus vannamei* juveniles[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(1): 30-38(in Chinese).
- [49] 王旭娜, 江敏, 钟锐, 等. 凡纳滨对虾养殖池塘中浮游植物群落结构与水质因子的关系[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1787-1803.
- Wang X N, Jiang M, Zhong R, *et al.* The relationship between phytoplankton community structure and water quality factors in the pond of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1787-1803(in Chinese).
- [50] Chand R K, Sahoo P K. Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 150-156.
- [51] 李倩, 周志明, 杭小英, 等. 南美白对虾不同养殖密度水质变化规律与养殖效益的分析[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(2): 100-104.
- Li Q, Zhou Z M, Hang X Y, *et al.* Analysis of water quality changes under different breeding density and breeding benefit of *Penaeus vannamei*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(2): 100-104(in Chinese).
- [52] 陈伟, 杜世聪, 刘佳佳, 等. 养殖水体悬浮物对对虾生长和浮游细菌群落的影响[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2019, 32(3): 1-8.
- Chen W, Du S C, Liu J J, *et al.* Effects of suspended solids on the growth of shrimps and bacterioplankton community of aquaculture systems[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2019, 32(3): 1-8(in Chinese).
- [53] 朱亦晨, 谭洪新, 罗国芝. 养殖密度对硝化型生物絮团系统中凡纳滨对虾生长和水质的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(1): 27-35.
- Zhu Y C, Tan H X, Luo G Z. Effect of different stocking density on growth performance of *Litopenaeus vannamei* and water quality in nitrifying bio-floc system[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(1): 27-35(in Chinese).

## Microbial community in *Litopenaeus vannamei* intestine and its aquaculture environment

JIN Ruochen<sup>1</sup>, JIANG Min<sup>1,2\*</sup>, SUN Shiyu<sup>1</sup>, DAI Xilin<sup>2,3</sup>, WU Hao<sup>2,3</sup>,  
ZHOU Junfang<sup>4</sup>, YU Zhongli<sup>5</sup>, ZHANG Feng<sup>6</sup>

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

5. Shanghai Fengxian District Aquatic Technology Promotion Station, Shanghai 201419, China;

6. Shanghai Siyang Aquaculture CO. LTD, Shanghai 201400, China)

**Abstract:** To explore the microbial community structure and changes in the intestine of *Litopenaeus vannamei* and its aquaculture environment during the cultivation process, Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform was used to analyze the microbial community in the gut of *L. vannamei* at age of 46 and 86 days, and its aquaculture water and sediments correspondingly, based on the 16S *rRNA* sequence. The results showed that the Shannon-Wiener diversity indexes in water samples were significantly lower than those in sediments and shrimp intestines. We detected 35 phyla, 70 classes, 152 orders, 274 families and 420 genera that existed in water, sediments and *L. vannamei* intestines. There were more common microbes in the intestines of *L. vannamei* and the sediments than those in the water. The microbial community structure of water, sediments and *L. vannamei* intestines changed when culturing time prolonged, the different phyla of 46 and 86 d were Actinobacteria, Chlorobi, Fibrobacteres, Planctomycetes and TM6. Relative abundance increased with time. However, the dominant flora was relatively fixed. At the phylum level, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria were the three dominant categories in all three kinds of samples. At the class level, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and Actinobacteria were the dominant categories. In addition, *L. vannamei* intestines and sediment had the common dominant classes of Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Gemmatimonadetes. From the classification levels of order, family and genus, the microbial community relative abundance in various samples presented differences, so that few common categories showed overlapping dominance in samples except unclassified genera, which was the most abundant in all the samples. Besides, hgcI\_clade was the dominant genus in the water, *Ambiguous\_taxa* was the predominant genus in the *L. vannamei* intestines and sediments. These results further explained the correlation of the microbial community structure in intestine of *L. vannamei* and its aquaculture environment, and also showed the differences that emerged during the culture process.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; aquaculture water; sediment; intestine; microbial community structure; diversity

**Corresponding author:** JIANG Min. E-mail: mjiang@shou.edu.cn

**Funding projects:** Research and Application of Shrimp Green Compound Feed (Grant No.20190305); Shanghai Shrimp Industry Technology System Program [Agriculture Research System of Shanghai, China (2014-5)]; The Project of Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206)