



不同养殖模式对凡纳滨对虾肠道微生物群落的影响

赵月季, 郭海朋*, 张德民

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了探究不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道微生物群落组成的差异, 本研究采用 16S *rRNA* 扩增子测序技术对 4 种不同养殖模式 [淡水池塘养殖模式 (FWP)、海水池塘养殖模式 (SP)、高位池养殖模式 (HP) 和生物絮团养殖模式 (BFP)] 下凡纳滨对虾的肠道微生物多样性和群落结构进行了研究。结果显示, FWP 和 HP 下凡纳滨对虾肠道菌群的 α 多样性指数显著高于 SP 和 BFP, 4 种养殖模式下凡纳滨对虾肠道微生物群落结构存在显著差异。变形菌门在 SP、BFP 和 HP 模式中具有较高的丰度, 并且是造成 4 种养殖模式肠道菌落差异的关键贡献类群, FWP 模式中蓝藻门的丰度远高于其他养殖模式。弧菌科和支原体科是 4 种养殖模式的共有核心微生物中最丰富的 2 个科。此外, 不同养殖模式的指示类群并不相同, FWP 模式的肠道细菌指示类群为丙酸杆菌科, BFP 养殖模式的指示类群为黄杆菌科。共现网络分析结果表明, HP 模式中肠道微生物的相互作用高于其他 3 种养殖模式, 而 FWP 养殖模式的肠道微生物菌群最稳定。

关键词: 凡纳滨对虾; 养殖模式; 肠道菌群; 核心类群; 共现网络

中图分类号: S 968.22

文献标志码: A

据 2018 年世界渔业和水产养殖状况显示, 自 2000 年起, 全球水产养殖产量已不再保持 20 世纪 80 和 90 年代的高速增长。尽管如此, 水产养殖产量的增速仍然快于其他主要的食品生产部门, 特别是亚洲内陆水产养殖中甲壳类动物产量增长迅速。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾、白脚虾, 是甲壳类动物养殖的主要种类, 其具有适温范围广 (6~39 °C), 适应盐度广 (0.5~50)、生长快、抗病性强、肉质可口和加工出肉率高等特点^[1], 是中国也是世界范围内的对虾养殖三大种类之一^[2]。我国凡纳滨对虾的主要养殖模式为淡水池塘养殖、海水池塘养殖和室内高位池养殖。池塘养殖模式结构简单、养殖密度低且资金投入少^[3], 但是可控性差, 难以维持养殖水质的稳定^[4]。高位池养殖模式虽

然养殖密度高、管理精细以及人为调控性强, 但是高密度的养殖导致对虾病害频发以及养殖环境的污染^[5]。为了养殖业可持续发展, 一种能够净化水质及维持高密度养殖的生物絮团养殖模式被广泛研究^[6], 但因其其在养殖过程中操作性较差、养殖成功率低, 还未被大规模应用于生产^[7]。

肠道微生物在维持对虾的生长和健康方面起重要作用。肠道微生物可以提高肠道消化吸收功能, 促进肠道营养平衡, 利于宿主的健康^[8], 正常的肠道菌群代谢产物有利于杀灭病原微生物以抑制病原体的生长^[9-10]。另外, 肠道微生物还有刺激免疫系统的发育和保持肠道屏障完整性等作用^[11]。近几年, 不同养殖模式下凡纳滨对虾的生理生化指标、饲料转化率及其免疫功能等方面已得到了广泛研究^[12], 但是不同养殖模式

收稿日期: 2020-03-18 修回日期: 2020-05-26

资助项目: 国家自然科学基金 (31672658); 宁波市重大科技专项 (2017C110001)

第一作者: 赵月季 (照片), 从事食品安全与质量控制研究, E-mail: 983205981@qq.com

通信作者: 郭海朋, E-mail: guohaipeng@nub.edu.cn



下凡纳滨对虾肠道微生物群落方面研究还鲜有报道。本研究采用 16S *rRNA* 扩增子测序技术对 4 种不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道微生物群落进行研究, 以期对凡纳滨对虾的微生态健康养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 生长参数测定及肠道样品采集

实验于 2018 年 9 月中旬在浙江宁波咸祥镇丹艳水产养殖场采集了 4 种养殖模式下的凡纳滨对虾成虾样品, 包括淡水池塘养殖模式 (FWP)、海水池塘养殖模式 (SP)、生物絮团养殖模式 (BFP) 及高位池养殖模式 (HP)。采集的凡纳滨对虾活虾放于车载冰箱中 (4 °C) 运至实验室后, 用标尺测量对虾个体体长 (从眼根部到尾尖, 精确至 1 mm), 每种养殖模式测定 15 条。FWP、SP、BFP 和 HP 等 4 种养殖模式下凡纳滨对虾平均体长分别为 11.5、9.8、9.0 和 11.2 cm。用无菌牙签挑取凡纳滨对虾肠道至无菌 EP 管中并迅速保存于 -80 °C 超低温冰箱用于 DNA 提取, 每 5 个整肠为 1 个重复, 每种养殖模式设置 5 个重复。

1.2 DNA 提取、细菌 16S *rRNA* 扩增和高通量测序

使用 QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 试剂盒提取凡纳滨对虾肠道 DNA, 用分光光度计 (NanoDrop ND-1000, USA) 测定 DNA 浓度和纯度。用带 Barcode 的引物 515F (5'-GTGYCAGC MGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACN-VGGGTWTCTAAT-3') 扩增 16S *rRNA* 的 V4 区。聚合酶链式反应 (PCR) 的扩增体系为 20 μ L, 每个样品设置 3 个 PCR 重复, 以降低扩增造成的偏差。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 28 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行纯化后, 再用 Agilent 2100 生物测定仪 (Agilent, 美国) 检测片段大小, 并用 Qubit 2.0 荧光光度计 (Life technologies, 美国) 定量。最后, 对 PCR 产物进行等摩尔合并, 在 Illumina MiSeq 平台上进行测序 (Illumina, 美国)。

1.3 测序数据处理

原始的 FASTQ 文件用 QIIME 进行组装, 并在 FLASH 的默认参数下进行拼接, 随后对拼接

后的序列用 QIIME 进行质控^[13]。剩下的序列用 USEARC 去除嵌合体, 用“pick_open_reference_otus.py”命令将相似性大于 99% 的序列归为同一个分类操作单元 (operational taxonomic units, OTU)。将各 OTU 代表序列与 Silva132 数据库比对以获得其物种分类信息, 去除古细菌 (archaea)、叶绿体 (chloroplast)、线粒体 (mitochondria) 及不能分类到细菌界的序列。原始的测序数据经上述步骤处理后, 总共获得了 1 308 097 个高质量序列, 生成 25 149 个 OTUs。使用 QIIME 计算每个样本物种 α 多样性指数, 包括丰富度指数 (Richness)、Shannon 指数及均匀度指数 (Pielou evenness index), 使用 Bray-Curtis 非相似性计算每个样本微生物群落的 β 多样性指数。

1.4 数据分析

基于 Bray-Curtis 非相似性进行主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA)。用 PRIMER-E V5 软件进行相似性分析 (analysis of similarity, ANOSIM), 检验凡纳滨对虾肠道菌群组间和组内结构的差异。用 R 语言“pheatmap”软件包绘制科水平组成热图; 使用 SPSS 13.0 软件的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对门和纲水平的细菌类群进行分析, 使用 Duncan 氏检验进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用基于 Bray-Curtis 距离的 SIMRER 分析表征 4 种养殖模式的凡纳滨对虾肠道细菌群落整体结构的差异及细菌群落的相似性。使用线性判别分析 (LEfSe) 比较 4 种养殖模式下凡纳滨对虾肠道细菌的关键差异类群。使用“labdsv”软件包筛选指示类群 (指示值 > 80 , $P < 0.01$), 并用 MEGA 7 软件构建指示类群进化树。使用“psych”软件包计算类群相关性矩阵, 保留皮尔森相关性系数 $|r| > 0.6$, 且 $P < 0.05$ 的数据矩阵, 使用 Gephi (v 0.9.2) 构建微生物群落的共现网络。

2 结果

2.1 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道微生物多样性及其组成

利用细菌群落的物种丰富度、Shannon 指数和群落均匀度指数表征细菌群落的 α 多样性。结果显示, FWP 和 HP 养殖模式下的肠道细菌群落的丰富度指数 (图 1-a)、Shannon 指数 (图 1-b) 和

均匀度指数(图 1-c)无显著性差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于 SP 和 BFP 养殖模式 ($P < 0.05$)。基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析结果显示, 4 种养殖模式下的细菌群落分区明显(图 1-d)。群落相似性分析 (ANOSIM) 也说明肠道细菌群落之间的

差异小于不同养殖模式之间的差异, 表明 4 种不同养殖模式之间的肠道细菌群落有显著差异 (表 1) ($P < 0.05$)。

从细菌类群 (门/变形菌纲水平) 组成来看, 不同养殖模式的优势类群不同 (图 2)。FWP 养殖

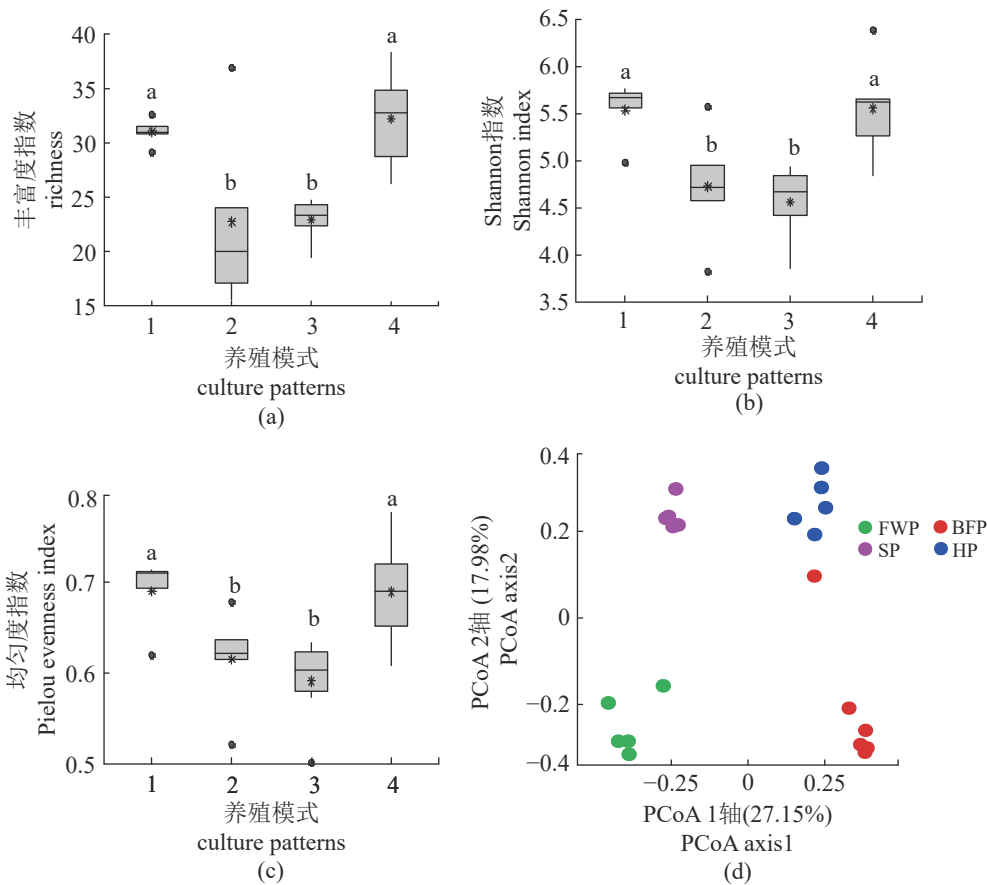


图 1 不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道细菌群落 α 多样性指数 (a-c) 和肠道细菌群落结构 PCoA 聚类分析 (d)
1. 淡水池塘养殖模式 (FWP), 2. 海水池塘养殖模式 (SP), 3. 生物絮团养殖模式 (BFP), 4. 高位池养殖模式 (HP); · 代表异常值, *代表中位数; 不同字母表示各组之间在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异; 下同

Fig. 1 α -diversity indexes (a-c) of intestinal bacterial community of *L. vannamei* in different culture patterns, PCoA cluster analysis of intestinal bacterial community structure (d)
1. Freshwater shrimp pond (FWP), 2. seawater pond (SP), 3. biofloc technology pond (BFP), 4. high-intensive pond (HP); · represents the abnormal value, * represents the median; different letters indicate a significant difference at $P < 0.05$; the same below

表 1 基于 Bray-Curtis 距离的 ANOSIM 相似性分析
Tab. 1 Analysis of similarity (ANOSIM) based on Bray-Curtis distance

ANOSIM	FWP		SP		BFP	
	R	P	R	P	R	P
SP	1	0.008				
BFP	0.992	0.002	0.976	0.002		
HP	0.976	0.008	0.976	0.008	0.904	0.002

注: R 值越接近 1, 表明组间差异越大, $P < 0.05$ 表示统计具有显著性
Notes: R value close to 1 indicates that the difference between groups is greater than that within the group. $P < 0.05$ indicates statistical significance

模式下的肠道菌群主要包括放线菌门 (Actinobacteria, 15.08%)、柔壁菌门 (Tenericutes, 14.96%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 14.28%)、蓝藻门 (Cyanobacteria, 12.01%) 和浮霉菌门 (Planctomycetes, 10.93%); SP 养殖模式下主要包括柔壁菌门 (45.61%) 和 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria, 35.17%); BFP 养殖模式下主要包括 γ -变形菌纲 (31.07%)、放线菌门 (30.31%) 和 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria, 16.65%); HP 养殖模式下主要包括 γ -变形菌纲 (32.99%)、 α -变形菌纲 (28.19%)、柔壁菌门 (13.13%) 和浮霉菌门 (12.88%)。其中, γ -变形菌纲在 SP、BFP 和 HP 养殖模式中占据优势地位, 且三者之间无显著性差异, 但其相对丰度都显著高于 FWP 养殖模式 ($P < 0.05$)。 α -变形菌纲和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度在 BFP 和 HP 中无显著差异, 但显著高于 FWP 和 SP; 疣微菌门、绿弯菌门 (Chloroflexi)、蓝藻门和厚壁菌门 (Firmicutes) 在 FWP 中的相对丰度都高于其他 3 种养殖模式, 且与 BFP 和 SP 均有显著性差异 ($P < 0.05$); SP 养殖模式中柔壁菌门的丰度最高, 而浮霉菌门丰度最低, 与其他 3 种养殖模式均存在显著性差

异 ($P < 0.05$)(图 3)。从科水平组成来看, 疣微菌门的 LD29、蓝藻门的 Family I 和丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 是 FWP 养殖模式特有的优势科; SP、BFP 和 HP 养殖模式特有的菌群分别为支原体科 (Mycoplasmataceae)、间孢囊菌科 (Intrasporangiaceae) 和浮霉菌科 (Planctomycetaceae)(图 4)。

2.2 不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道核心微生物类群组成

4 种养殖模式下凡纳滨对虾肠道核心微生物 OUT 数为 86 个, 占总 OTU 数的 0.3%, 但其序列数 (reads) 占总序列数的 23.1%(图 5-a)。这些核心 OTUs 中, 变形菌门占据优势地位, 占核心微生物总相对丰度的 61.1%(25 个 OTUs), 而弧菌科 (Vibrionaceae) 是变形菌门中丰度最高的科, 占核心微生物总相对丰度的 52.8%。柔壁菌门占核心微生物 OTU 总相对丰度的 35.0%(46 个 OTUs), 并且都属于支原体科。拟杆菌门和厚壁菌门分别占核心微生物总相对丰度的 1.9%(5 个 OTUs)、1.8%(1 个 OTU), 且其门类下都只有一个科。放线菌门也是 4 种养殖模式的核心菌群, 其相对丰

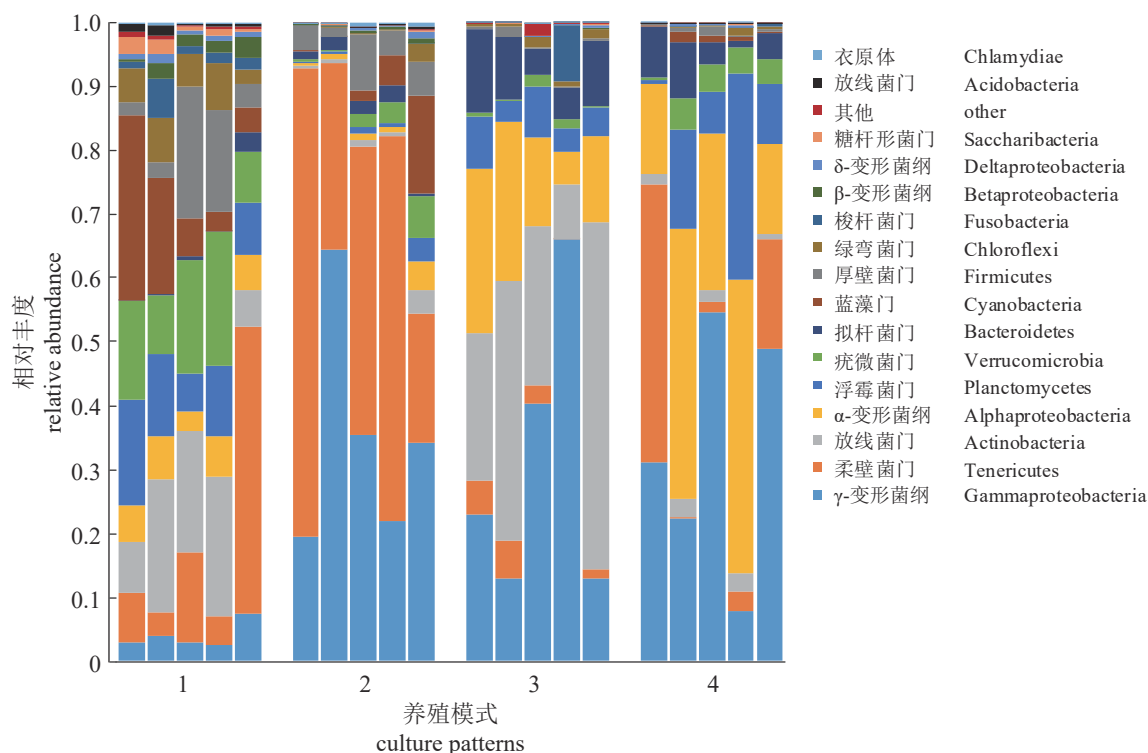


图 2 不同养殖模式的凡纳滨对虾肠道细菌群落优势门/变形菌纲 (>2%) 相对丰度图

Fig. 2 Relative abundance of dominant phyla/Proteobacteria classes (>2%) in the guts of *L. vannamei* in different culture patterns

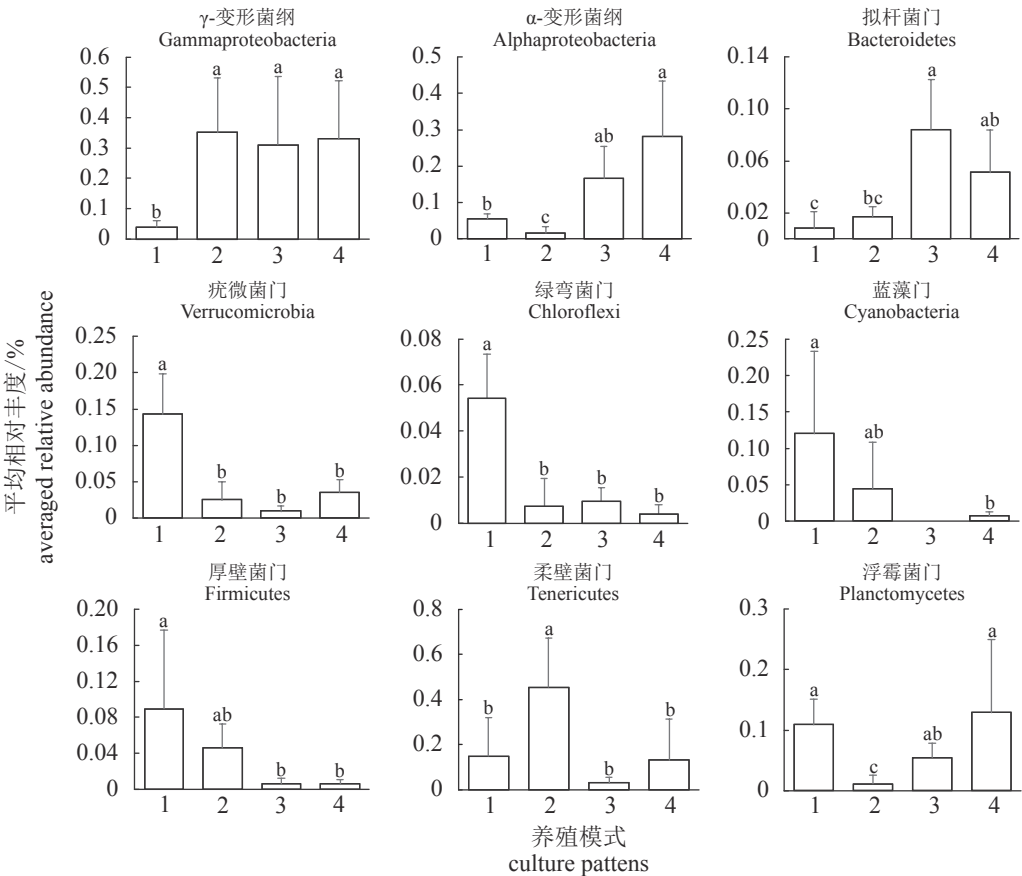


图 3 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道细菌主要门/纲的平均相对丰度>1% 的单因素方差分析
不同字母表示有显著性差异 $P<0.05$

Fig. 3 One-Way ANOVA of the average relative abundance of dominant phyla/Proteobacteria classes (>1%) of *L. vannamei* intestinal bacteria in different culture patterns

Different letters indicate significance levels $P < 0.05$



图 4 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道细菌群落优势科 (>1%) 相对丰度图

Fig. 4 Relative abundance of the dominant families (> 1%) in intestinal bacterial community of *L. vannamei* in different culture patterns

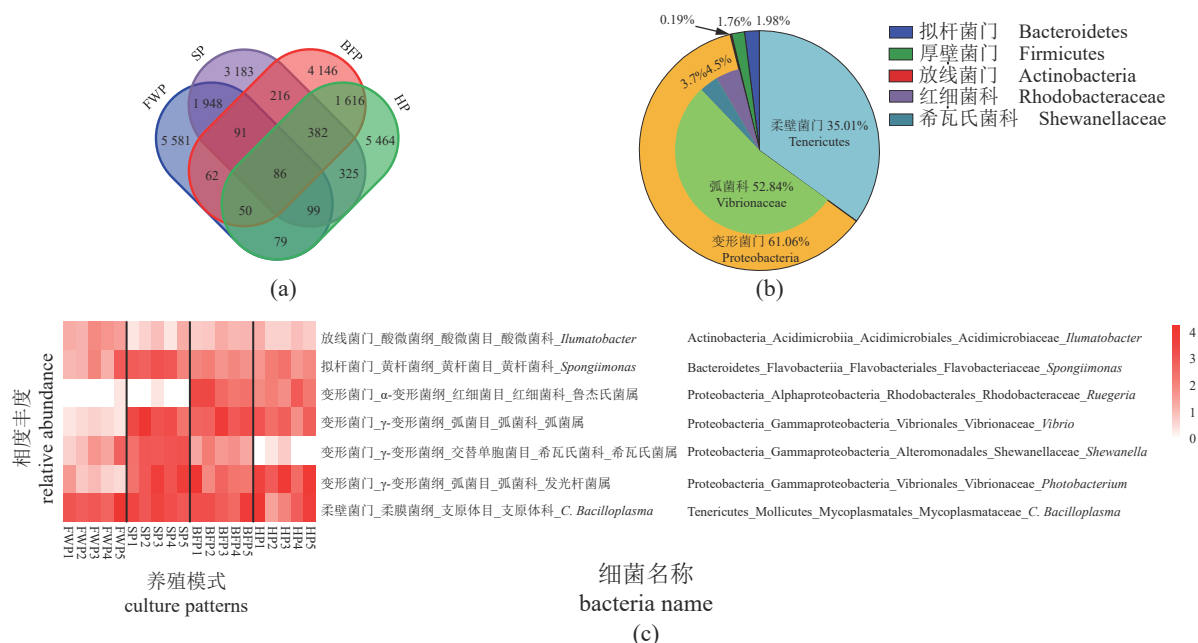


图5 4种养殖模式下凡纳滨对虾肠道核心微生物类群分析图

(a) 肠道细菌群落微生物 OTU 个数的韦恩图; (b) 4 种养殖模式共有 OTU 丰度图, 外圈为门水平优势类群, 内圈为科水平优势类群; (c) 左边为 4 种养殖模式共有 OTU 的相对丰度, 右边表示分类到属水平

Fig. 5 Core microbial analysis of intestinal microbiota for *L. vannamei* in four culture patterns

(a) Venn diagram of OTU numbers in intestinal bacterial community; (b) abundance of shared OTUs in four culture patterns, the outer circle represents the dominant taxa at the phylum level, the inner circle indicates the dominant taxa at family level; (c) relative abundances of shared OTUs in four culture patterns are showed on the left, and the corresponding genera are showed on the right

度占比为 0.2%(9 个 OTUs)(图 5-b)。在 FWP 养殖模式中, 核心 OTU 分别占总 OTU 数和总序列数的 1.1% 和 22.9%, *Candidatus bacilloplasma*(属于柔壁菌门) 是丰度最高的属, 在 FWP 的核心菌群中占绝对优势; 在 SP 养殖模式中, 核心 OTU 占其总 OTU 数和总序列数的 1.7% 和 31.4%, 在 BFP 养殖模式中分别为 1.3% 和 23.2%, 在 HP 养殖模式中分别为 1.1% 和 26.4%。核心微生物相对丰度结果表明, 鲁杰氏菌属 (*Ruegeria*) 主要分布在 BFP 和 HP 养殖模式中; 希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 在 SP 养殖模式中最高, 而在 HP 养殖模式中的丰度较低 (图 5-c)。

根据 SIMPER 分析, 筛选出了 11 个关键 OTUs (贡献度大于 1%), 解释了不同养殖模式中 24.1% 的肠道细菌群落差异 (图 6), 其中贡献度最高的为 BDMQ(属于弧菌科), 为 4.061%。4 种养殖模式的 5 个核心 OTUs, 如 BDMQ(属于弧菌科)、HE 610324.1.1554(属于支原体科)、KU524786.1.1516(属于弧菌科)、New. Reference OTU1(属于弧菌科) 和 New. Reference OTU2(属于支原体科), 5 个核心 OTU 的总贡献度为 12.5%(图 5, 图 6)。

2.3 不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道指示类群

利用线性判别分析筛选每个养殖模式下凡纳滨对虾肠道中细菌的主要判别类群。FWP 养殖模式下的判别类群为属于厚壁菌门的梭菌目 (*Clostridiales*) 和丹毒丝菌科 (*Erysipelotrichaceae*)、γ-变形菌纲的考克斯体科 (*Coxiellaceae*)、放线菌门的丙酸杆菌科、蓝藻门的聚球藻属 (*Synechococcus*) 和 Subsection I、β-变形菌纲 (*Betaproteobacteria*) 的伯克氏菌目 (*Burkholderiales*); SP 养殖模式下的主要判别类群为属于厚壁菌门的芽孢杆菌目 (*Bacillales*), 属于柔壁菌门的 *C. bacilloplasma* 以及属于 γ-变形菌纲的弧菌属 (*Vibrio*)、希瓦氏菌属和气单胞菌科 (*Aeromonadaceae*); BFP 养殖模式下的关键类群有拟杆菌门的鼠尾菌属 (*Muricauda*) 和海菌属 (*Maribacter*)、绿弯菌门的 JG30_KF_CM45 和热微菌纲 (*Thermomicrobia*)、放线菌门的微杆菌属 (*Microbacterium*)、α-变形菌纲 *Amaricoccus*、鞘脂单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*) 和红小梨形菌属 (*Rhodopirellula*); HP 养

殖模式下的主要判别类群为 γ -变形菌纲的 OM60_NOR5_clade 和海仙菌属 (*Haliea*)、浮霉菌纲的芽小梨形菌属 (*Blastopirellula*)、Pir4lineage、红细菌目 (*Rhodobacterales*) 的 *Marivita*、鲁杰氏菌

属、玫瑰变色菌属 (*Roseovarius*)、拟杆菌门的嗜冷菌属 (*Algoriphagus*)、疣微菌门的盐杆条菌属 (*Haloferula*) (图 7)。



图 6 凡纳滨对虾肠道中细菌群落相似性百分比

Fig. 6 Similarity analysis of *L. vannamei* bacterial communities

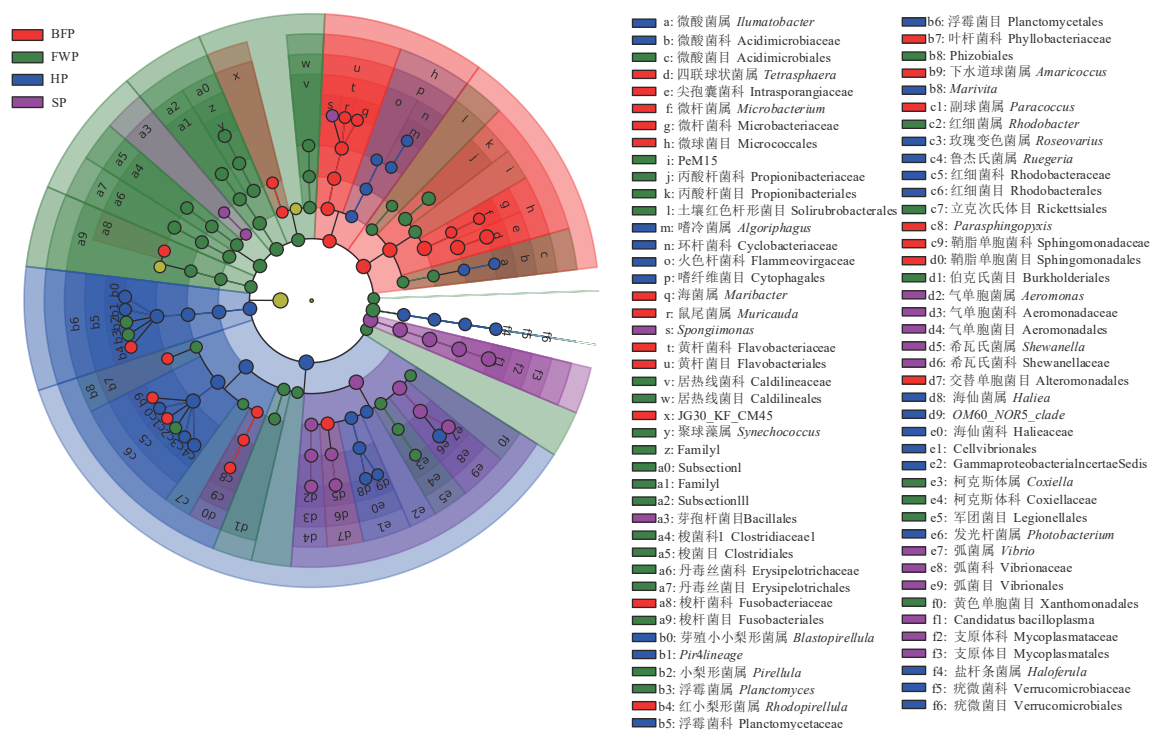


图 7 凡纳滨对虾肠道细菌群落的线性判别分析

Fig. 7 Linear discriminant analysis of *L. vannamei* bacterial communities

Different species are colored according to the group, the red nodes indicate the microbial groups that play an important role in the red group, the other circle colors have similar meanings

4种养殖模式中共挑选出129个指示类群(指示值>80, $P<0.01$)。FWP养殖模式的指示类群主要来自于丙酸杆菌科、Chthoniobacteriales和浮霉菌科等;SP养殖模式的指示类群主要属于支原体科、气单胞菌科和希瓦氏菌科;BFP养殖模式的指示类群来自于黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和孢子囊藻科;HP养殖模式的指示类群来自于红细菌科(Rhodobacteraceae)、浮霉菌科和海百合科(Haliaceae)等(图8)。

2.4 不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道菌群共现模式

4种养殖模式下凡纳滨对虾的肠道菌群共现模式不同(图9)。HP养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群的共现网络节点数、边和平均度最高,FWP养殖模式下聚类系数和平均路径长度都高于其他3种养殖模式;从表2可以看出,在BFP养殖模式下,除了模块化系数比FWP和SP养殖模式高,其他拓扑学参数都为最低。FWP养殖

模式的共现网络中形成2个相互关系密切的网络,其中1个网络主要包含来自支原体科和黄杆菌科、希瓦氏菌科、弧菌科和Family I(属于蓝藻门)5个科的OTUs;另1个网络主要包含来自于浮霉菌科、PeM15(属于放线菌门)、LD29(属于疣微菌门)3个科的OTUs。此外,支原体科在该网络中与其他菌群联系最为密切,是该模式中的主要类群。在SP养殖模式的共现网络中,来自于浮霉菌科、LD29、Family I(属于蓝藻门)和红细菌科的OTUs相互关系密切,形成1个网络。BFP养殖模式的共现网络中属于弧菌科和红细菌科的OTU出现频率最高且联系较为密切。此外,红细菌科还与黄杆菌科有较强的相互作用。HP养殖模式的菌群呈现出复杂的相关性,其模块的核心类群主要为支原体科、浮霉菌科、弧菌科和红细菌科。BFP养殖模式中弧菌科和红细菌科占优势地位;支原体科是FWP模式和SP模式中相关性最高的类群(图9)。

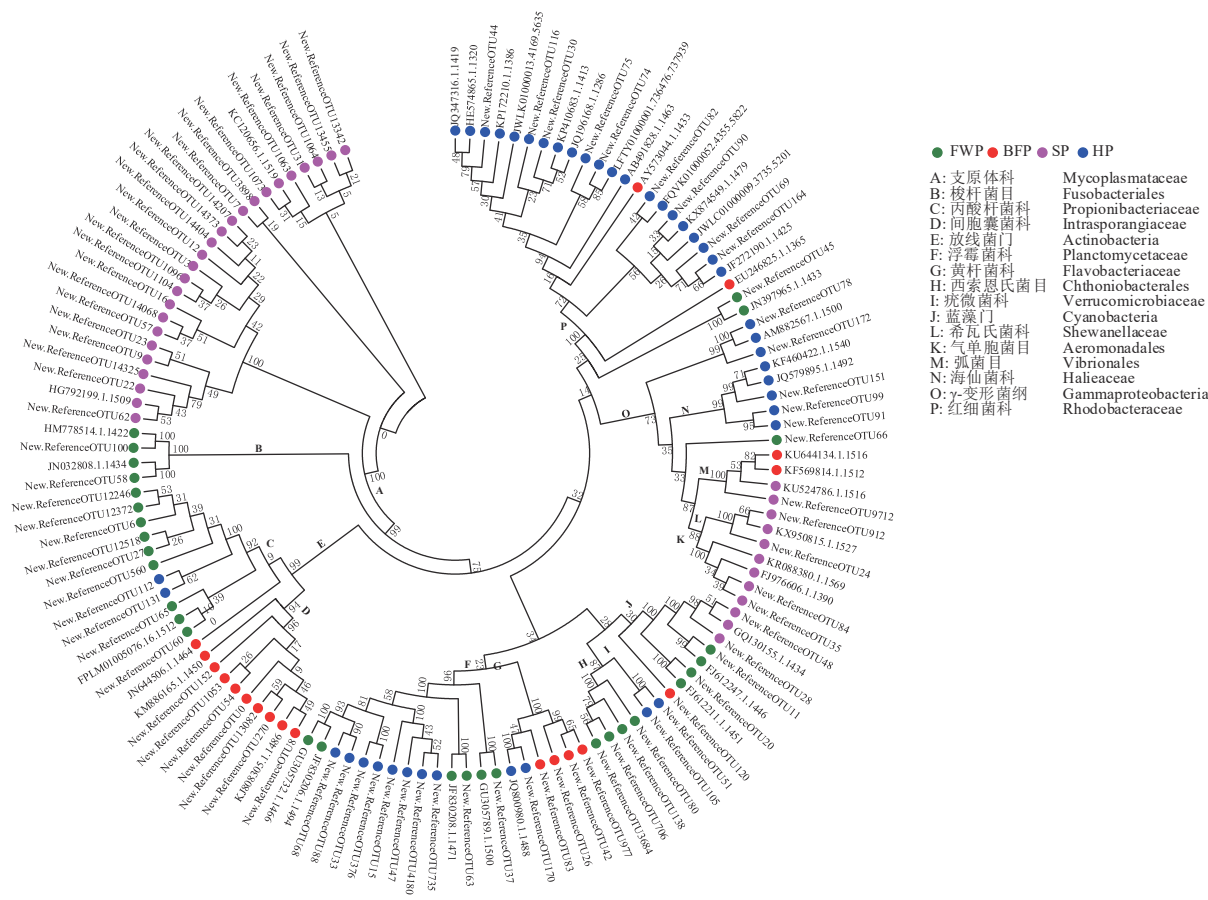


图8 不同养殖模式下的指示类群系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic trees of indicator taxa for different culture patterns

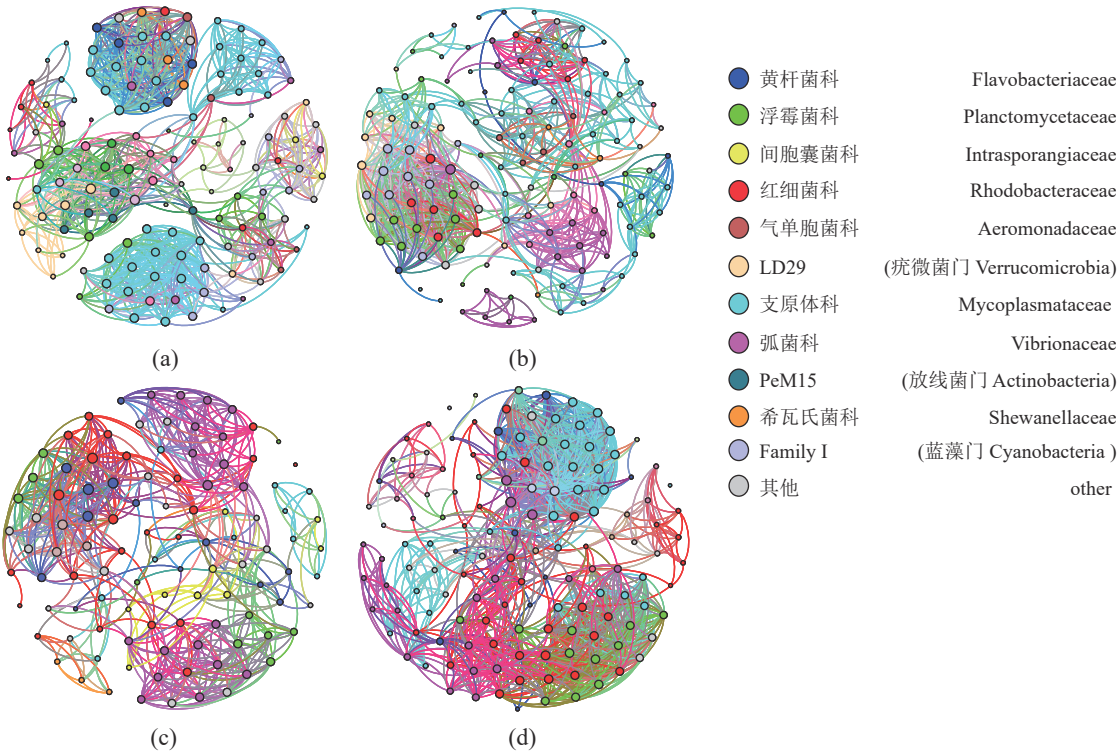


图 9 不同养殖模式下的凡纳滨对虾肠道细菌群落的共现关系

(a) 淡水池塘养殖模式 (FWP), (b) 海水池塘养殖模式 (SP), (c) 生物絮团养殖模式 (BFP), (d) 高位池养殖模式 (HP); 每个节点的大小与连接数成比例, 每个节点定义在科水平, 相同的节点颜色归属于同一个科

Fig. 9 Co-occurrence relationship of intestinal bacterial communities for *L. vannamei* in different culture patterns

(a) Freshwater shrimp pond (FWP), (b) represents seawater pond (SP), (c) biofloc technology pond (BFP), (d) high-intensive pond (HP); the size of each node is proportional to the number of connections; each node is defined at the family level, and the same color represents same family

表 2 不同养殖模式下的共现网络的拓扑学参数

Tab. 2 Topological parameters of co-occurrence network for different culture patterns

养殖模式 culture patterns	节点 nodes	边 edges	模块化系数 modularity	聚类系数 clustering coefficient	网络直径 network diameter	平均路径长度 average path length	平均度 average degree
FWP	137	981	0.828	0.833	10	4.707	14.321
SP	137	855	0.757	0.734	12	4.057	12.482
BFP	106	632	0.834	0.727	10	3.525	11.925
HP	140	1223	1.024	0.760	12	3.965	17.471

3 讨论

3.1 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群结构存在差异

肠道微生物可以调节肠道环境, 促进肠道菌群平衡, 有利于宿主健康^[14]。研究发现, 肠道细菌群落的变化和对虾病害的严重程度密切相关, 肠道微生物紊乱可能导致宿主生长缓慢或感染疾病^[15-16]。有研究证明, 养殖环境可能影响

对虾的肠道微生物群落结构^[17]。对虾养殖生态系统的富营养化会破坏浮游细菌群落的稳定性, 对凡纳滨对虾造成环境压力进而导致病害发生^[18]。不同的饲料类型也影响凡纳滨对虾肠道菌群的组成^[19]。此外, 肠道菌群组成还与养殖水体温度、盐度、pH 等密切相关^[20], 而对不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道微生物结构差异的研究较少。本实验中 FWP 和 HP 养殖模式下的肠道细菌群落的丰富度指数、Shannon 指数和均匀度指数均

显著高于 SP 和 BFP 模式, 而 FWP 养殖模式的肠道菌群的均匀度优于 HP 养殖模式, 这与 FWP 养殖模式下的肠道微生物在门、变形菌纲及科水平上的几种重要菌群的丰度比较平均相一致(图 1, 图 2)。 γ -变形菌纲在 SP、BFP 和 HP 养殖模式中具有较高的丰度, 其优势科为弧菌科。与本研究相同, 海水养殖和高位池养殖中都发现了高丰度的弧菌科^[21-22]。在 BFP 养殖过程中, 尽管生物和非生物因素使其细菌群落具有高度的变异性, 但是无论在养殖水还是在凡纳滨对虾肠道中弧菌科都是优势科^[23]。此外, 在 FWP 养殖模式中, 蓝藻门的丰度远远高于其他养殖模式。这与 Fan 等^[24]关于淡水养殖中对虾肠道易富集蓝藻门细菌, 而海水养殖主要富集弧菌科细菌的研究结果相同。

3.2 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群的指示类群不同

弧菌科和支原体科是 4 种养殖模式共有核心微生物中最丰富的 2 个科, 但是弧菌科主要存在于 SP、BFP 和 HP 养殖模式中(图 5-b, c)。通过 SIMPER 分析, 发现共有的弧菌科和支原体科对 4 种养殖模式菌群差异贡献度最高(图 6)。弧菌科和支原体科被认为是条件致病菌^[25-26], 当养殖水质恶化时容易引起对虾疾病暴发。研究发现, 在对虾病害暴发期间, 养殖水体和对虾肝胰腺中的细菌群落以弧菌为主^[27], 已经发现有十种对虾疾病与弧菌有关, 弧菌类疾病已经被确认为是虾类养殖中的严重病害之一^[28-29]。研究发现支原体可能与免疫类、肿瘤类疾病有关^[30-31], 是对虾养殖业中常见的病原微生物, 多与对虾的肝胰腺疾病有关^[32-33]。在 SP、BFP 和 HP 这 3 种海水养殖模式中, 弧菌科和支原体科相对丰度都较高, 这可能是海水养殖凡纳滨对虾容易暴发弧菌病和肝胰腺坏死等疾病的原因。此外, 由于支原体易侵入宿主细胞而不侵入宿主肌肉, 因此常充当感染先驱的角色, 与其他致病菌混合感染宿主^[34]。当弧菌科和支原体科混合感染宿主时极易引发弧菌类疾病以及一些水产品病害。同时一些致病弧菌在环境恶化时的致病性增强, 更易暴发疾病^[35-36]。因此, 在凡纳滨对虾海水养殖中要密切关注养殖环境变化, 尤其在 BFP 和 HP 等养殖密度大、水流不畅的养殖模式中, 以防条件性致病菌暴发引起疾病。而 FWP 养殖模

式中有较高丰度的支原体科类群, 表明在淡水养殖中可能需要更多关注凡纳滨对虾肝胰腺类疾病的发生。

肠道细菌群落的指示类群可用于评估对虾的健康状况^[37]。丙酸杆菌科是 FWP 养殖模式的指示类群(图 7, 图 8), 研究发现, 口服丙酸杆菌有利于预防小鼠肠道感染^[38], 在 2008 年有学者提出, 可以在水产养殖中使用放线菌作为益生菌来防治水产养殖病害^[39]。此外, 研究表明丙酸杆菌科在正常生长的健康对虾肠道菌群中丰度较高^[40], 因此, 丙酸杆菌科作为 FWP 养殖模式的肠道微生物中的指示类群, 可能对淡水养殖中凡纳滨对虾的生长发挥着益生的作用。SP 养殖模式没有特别的指示类群, 主要指示类群为支原体科, 但是支原体科也是 4 种养殖模式的共有类群, 由此可知, 支原体科可能是海水养殖中潜在的病原微生物, 危害对虾生长。BFP 养殖模式的指示类群为黄杆菌科, 其广泛存在于海水再循环养殖系统的生物滤池中^[41], 这也与 Huang 等^[42]发现在生物絮团中存在高丰度的黄杆菌科相一致。黄杆菌科不仅参与有机化合物降解, 还参与氨、亚硝酸盐和硝酸盐的转化, 在维持高密度养殖环境的稳定方面起重要作用^[43]。水体环境影响对虾肠道微生物的组成, BFP 养殖系统中的生物絮团可以被凡纳滨对虾摄食, 因此 BFP 养殖系统中的微生物可能更容易在肠道定植^[42]。红细菌科是 HP 养殖模式下凡纳滨对虾肠道细菌的主要指示类群, 与 Landsman 等^[44]的研究相同, 即在室内养殖系统中凡纳滨对虾肠道红细菌科菌群的丰富度明显高于池塘养殖和野生的凡纳滨对虾。

3.3 不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群共现网络存在差异

研究表明, 细菌相互作用增加和共享生态位的结合使网络规模及其复杂性增加, 代表了不同样本微生物之间的根本差异^[45], 例如, 健康的土壤菌落的菌群之间联系紧密、模块化高, 使整个网络稳定且充满活力, 从而保持生态系统的稳定^[46]。肠道菌群影响凡纳滨对虾的生理健康, 稳定的肠道菌群可在一定程度上避免凡纳滨对虾染上细菌性疾病^[47]。本研究中, 4 种养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群的共现网络不同, 说明不同养殖模式可能影响了凡纳滨对虾肠道

微生物的稳定性。FWP 养殖模式下菌群之间节点的连接性、连接的传递性、形成聚类的概率以及节点之间的紧密性最优且模块化程度最高, 表明 FWP 养殖模式下的肠道菌群稳定性高于其他养殖模式^[48]。在网络模块中具有高度连接性的类群称作模块中心点, 模块中心点的减少或者消失都会导致模块和网络的破裂, 而模块和网络的破坏会导致菌群失衡, 从而影响宿主健康^[49]。HP 养殖模式中, 节点与节点之间的连接以及菌群之间的相关性最复杂, 并且具有最高的中心性。HP 养殖模式往往具有很高的养殖密度, 容易积聚氨氮等毒性物质, 可能影响了凡纳滨对虾肠道菌群之间的相互作用 (图 9)。SP 养殖模式的拓扑学参数仅次于 FWP 养殖模式, 其菌群稳定性不如 FWP 养殖模式, 可能是因为受到了 2 种致病菌的胁迫。此外, SP 养殖模式的共现网络中, 弧菌科和支原体科没有形成稳定的模块, 可能说明 SP 养殖模式下凡纳滨对虾肠道菌群比 FWP 养殖模式易受到养殖环境的影响。

综上所述, 养殖模式影响了凡纳滨对虾肠道菌群的多样性和结构组成。FWP 和 HP 养殖模式下的肠道细菌群落有更高的丰富度、多样性和均匀度。弧菌和支原体是 4 种养殖模式的核心微生物, 但其指示类群不同, 丙酸杆菌科是 FWP 养殖模式的指示类群, BFP 养殖模式的指示类群为黄杆菌科。通过分析不同养殖模式下凡纳滨对虾肠道微生物的共现网络, 发现 HP 养殖模式下肠道菌群平衡易受养殖环境影响, FWP 养殖模式下肠道菌群稳定性高于其他养殖模式。

参考文献 (References):

- [1] 刘晓慧. 不同来源的虾青素对凡纳滨对虾幼虾的影响及作用机制 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2018: 1-12.
Liu X H. Effect of natural and synthetic astaxanthin on *Litopenaeus vannamei*, in the nursery phase[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2018: 1-12 (in Chinese).
- [2] 康保超. 南美白对虾养殖效益和社会经济学分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 1-10.
Kang B C. Economic benefit and social economics analysis on *Litopenaeus vannamei* farming[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014: 1-10 (in Chinese).
- [3] Xie B, Yu K J. Shrimp farming in China: operating characteristics, environmental impact and perspectives[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2007, 50(7): 538-550.
- [4] Ullman C, Rhodes M A, Davis D A. Feed management and the use of automatic feeders in the pond production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 44-49.
- [5] Hopkins J S, Sandifer P A, Browdy C L. Sludge management in intensive pond culture of shrimp: effect of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp production[J]. *Aquacultural Engineering*, 1994, 13(1): 11-30.
- [6] Bossier P, Ekasari J. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(5): 1012-1016.
- [7] 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. 上海: 上海海洋大学, 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).
- [8] Sommer F, Anderson J M, Bharti R, *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 630-638.
- [9] Messer J S, Liechty E R, Vogel O A, *et al.* Evolutionary and ecological forces that shape the bacterial communities of the human gut[J]. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(3): 567-579.
- [10] Libertucci J, Young V B. The role of the microbiota in infectious diseases[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(1): 35-45.
- [11] Zhang Z Y, Tang H S, Chen P, *et al.* Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2019, 4(1): 41.
- [12] Allan G L, Maguire G B. Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon* Fabricius in model farming ponds[J]. *Aquaculture*, 1992, 107(1): 49-66.
- [13] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequen-

- cing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [14] 胡健微. 肠道微生物相互作用的研究及体外肠道模拟系统的构建和应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2017: 1-6.
- Hu J W. Interaction of intestinal microbes and construction and application of intrinsic intestinal simulation system[D]. Changchun: Jilin University, 2017: 1-6 (in Chinese).
- [15] 邓冠华. 抗微生物药长期给药对小鼠肠道微生物组多样性的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013: 1-39.
- Deng G H. Effects of long-term treatment of anti-microbial drugs on mouse gut microbiota determined with Illumina sequencing of 16S *rRNA* tags[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013: 1-39 (in Chinese).
- [16] Dai W F, Sheng Z L, Chen J, *et al.* Shrimp disease progression increases the gut bacterial network complexity and abundances of keystone taxa[J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734802.
- [17] Yan Q Y, Li J J, Yu Y H, *et al.* Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 4739-4754.
- [18] Yang W, Zheng C, Zheng Z M, *et al.* Nutrient enrichment during shrimp cultivation alters bacterioplankton assemblies and destroys community stability[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 156: 366-374.
- [19] Zhang M L, Sun Y H, Chen K, *et al.* Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 449-455.
- [20] Burns A R, Stephens W Z, Stagaman K, *et al.* Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 655-664.
- [21] Hou D, Huang Z, Zeng S, *et al.* Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(3): 792-799.
- [22] Wang J, Huang Y J, Xu K H, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 130-137.
- [23] 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.
- [24] Fan L F, Wang Z L, Chen M S, *et al.* Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 657: 1194-1204.
- [25] 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.
- [26] Holben W E, Williams P, Saarinen M, *et al.* Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 44(2): 175-185.
- [27] Sung H H, Hsu S F, Chen C K, *et al.* Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation[J]. *Aquaculture*, 2001, 192(2-4): 101-110.
- [28] Jayasree L, Janakiram P, Madhavi R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India)[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2006, 37(4): 523-532.
- [29] Karunasagar I, Karunasagar I, Umesha R K. Microbial diseases in shrimp aquaculture[M]. National Institute of Oceanography, 2004, 13: 121-134.
- [30] Chan L Y, Chan J C. Mycoplasma pneumoniae infection presenting as haemolytic anaemia[J]. *British Journal of Hospital Medicine*, 1997, 58(4): 170-171.
- [31] Huang S, Li J Y, Wu J, *et al.* Mycoplasma infections and different human carcinomas[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2001, 7(2): 266-269.
- [32] Deeseenthum S, Leelavatcharamas V, Brooks J D. Effect of feeding *Bacillus* sp. as probiotic bacteria on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(9): 1481-1485.
- [33] Krol R M, Hawkins W E, Overstreet R M. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, 57(3): 362-370.
- [34] 杨季芳. 支原体在暴发性虾病中的作用、地位及其他

- 病原微生物的关系 [C]//第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会. 青岛: 中国海洋潮沼学会, 2007.
- Yang J F. The role and status of mycoplasma in fulminant shrimp disease and the relationship between other pathogenic microorganisms[C]//The 2nd National Symposium on Integrated Control and Environmental Management of Artificial Shrimp Diseases. Qingdao: Chinese Society for Oceanology and Limnology, 2007 (in Chinese).
- [35] 林克冰, 周宸, 刘家富, 等. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. *海洋科学*, 1999, 23(4): 58-62.
- Lin K B, Zhou C, Liu J F, *et al.* Studies on the pathogenic bacteria of *Pseudosciaena crocea* in marine cage culture[J]. *Marine Sciences*, 1999, 23(4): 58-62(in Chinese).
- [36] 胡超群, 陶保华. 综述: 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展[J]. *热带海洋*, 2000, 19(3): 84-94.
- Hu C Q, Tao B H. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: a review[J]. *Tropic Oceanology*, 2000, 19(3): 84-94(in Chinese).
- [37] 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.
- [38] Alvarez S, Medici M, Vintini E, *et al.* Effect of the oral administration of *Propionibacterium acidipropionici* on IgA levels and on the prevention of enteric infection in mice[J]. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 1996, 14(3): 237-244.
- [39] 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.
- [40] Fan L F, Li Q X. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 450-461.
- [41] 张海耿, 马绍赛, 李秋芬, 等. 循环水养殖系统(RAS)生物载体上微生物群落结构变化分析[J]. *环境科学*, 2011, 32(1): 231-239.
- Zhang H G, Ma S S, Li Q F, *et al.* Analysis of the changes of microbial community structure on bio-carrier of recirculating aquaculture system (RAS)[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(1): 231-239(in Chinese).
- [42] Huang L, Guo H P, Chen C, *et al.* The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735159.
- [43] 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.
- [44] Landsman A, St-Pierre B, Rosales-Leija M, *et al.* Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(4): 93.
- [45] Shi S J, Nuccio E E, Shi Z J, *et al.* The interconnected rhizosphere: high network complexity dominates rhizosphere assemblages[J]. *Ecology Letters*, 2016, 19(8): 926-936.
- [46] Lu L H, Yin S X, Liu X, *et al.* Fungal networks in yield-invigorating and-debilitating soils induced by prolonged potato monoculture[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65: 186-194.
- [47] Tseng D Y, Ho P L, Huang S Y, *et al.* Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 339-344.
- [48] De Vries F T, Griffiths R I, Bailey M, *et al.* Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3033.
- [49] Olesen J M, Bascompte J, Dupont Y L, *et al.* The modularity of pollination networks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(50): 19891-19896.

Effects of different culture patterns on the intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Yueji, GUO Haipeng*, ZHANG Demin

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To explore the differences of intestinal microbiota for *Litopenaeus vannamei* in different culture patterns, bacterial diversity and bacterial community composition of *L. vannamei* from different culture patterns including freshwater pond (FWP), seawater pond (SP), high-intensive pond (HP) and biofloc technology pond (BFP) were studied by using the 16S *rRNA* gene amplicon sequencing technology in this study. The results showed that the α -diversity indexes of FWP and HP were significantly higher than those of SP and BFP. The relative abundances of intestinal microbiota compositions were significantly different among the four culture patterns. Proteobacteria had the maximal abundance in SP, BFP and HP culture patterns and contributed to the biggest differences for the four culture patterns. The abundance of Cyanobacteria in FWP culture pattern was far higher than that in other culture patterns. Vibrionaceae (Proteobacteria) and Mycoplasmataceae (Tenericutes) were the top two abundant families of core microbiota among the four culture patterns. In addition, the indicators of different culture patterns were different. The indicator group of intestinal bacteria in FWP culture pattern was Propionibacteriaceae, and it was Flavobacteriaceae in BFP culture pattern. Co-occurrence network analysis found that the interactions of intestinal microbiota in the HP culture pattern were higher than that in other three culture patterns, and the co-occurrence network of FWP was the most stable.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; culture patterns; intestinal microbiota; core microbiota; co-occurrence network

Corresponding author: GUO Haipeng. E-mail: guohaipeng@nub.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672658); Major Science and Technology Project of Ningbo, China (2017C110001)