



凡纳滨对虾白便综合征发生与环境因子、机体免疫酶活性和微生物的相关性

王印庚^{1*}, 于永翔¹, 蔡欣欣¹, 张正¹, 王春元¹, 廖梅杰¹,
李彬¹, 荣小军¹, 朱洪洋¹, 戴岩²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室,

海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

2. 连云港海洋水产开发有限公司, 江苏 连云港 222199)

摘要: 为系统解析凡纳滨对虾白便综合征 (white feces syndrome, WFS) 的发生与环境因子、微生物因子、宿主免疫力和水体微生物群落组成的关系。实验利用水体理化因子、可培养细菌、对虾机体免疫酶活性以及高通量测序等检测技术对健康与患 WFS 的池塘养殖凡纳滨对虾进行比较分析。结果显示, 与健康组相比, 患病池塘的水温、溶解氧 (DO)、pH、盐度等水质理化因子波动趋势相似, 波动范围分别为 26.1~29.0 °C、4.26~6.08 mg/L、8.39~8.73 和 40~49, 患病组 DO 和盐度比健康组高; 健康组对虾肝胰腺内可培养细菌和弧菌含量为 $1.19 \times 10^5 \sim 7.70 \times 10^5$ 和 $8.8 \times 10^3 \sim 1.96 \times 10^4$ CFU/g, 弧菌占比为 2%~16%, 患病组对虾肝胰腺内可培养细菌和弧菌含量在 $3.80 \times 10^5 \sim 2.51 \times 10^6$ 和 $2.02 \times 10^5 \sim 1.49 \times 10^6$ CFU/g 范围内, 比健康组高 15~113 倍, 弧菌占比在 55%~70%。碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP)、溶菌酶 (LZM)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和酚氧化酶 (PO) 活性在健康组内为 1.21~5.64、9.17~15.25、3.56~7.43、4.83~6.70 及 3.10~4.55 U/mg, 在患病组内为 2.12~5.39、19.22~26.96、19.73~26.85、3.00~4.14 及 7.76~9.21 U/mg。比较分析表明, WFS 的发生与可培养细菌含量、弧菌占比、ACP、LZM、PO 的相关性较强。高通量测序分析表明, 患病组水体菌群结构的 Ace 和 Chao 指数呈一定程度下降趋势, PCoA 指数偏离度较高, 放线菌门、变形菌门相对丰度降低, 拟杆菌门、蓝藻门相对丰度显著升高; RDA 关联分析表明, 盐度、溶解氧、虾体细菌、虾体弧菌、水体细菌是影响患病对虾水体菌群结构组成的重要因子。相关研究结果为解析养殖生产中对虾 WFS 发生机制提供数据支撑, 并为 WFS 的临床防控奠定理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 白便综合征; 水质理化因子; 可培养细菌; 机体免疫力; 菌群结构

中图分类号: S 945.1⁺2

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 生长速率快、耐高温、抗病力强, 是我国对虾养殖的优良品种, 同时也是世界养殖产量最高的 3 种优良虾种之一^[1]。随着对虾养殖业的快速发展和不规范

运作, 在对虾养殖产业中细菌病、病毒病、寄生虫病等病害问题日趋严重, 其中细菌性病害发生区域广、发病问题复杂、病原种类繁多, 严重制约着对虾养殖业的健康稳定发展^[2-4]。对虾白便综

收稿日期: 2021-07-24 修回日期: 2021-09-05

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900102); 泰山产业领军人才项目 (LJNY201802); 苏北科技专项 (SZ-LYG202028)

通信作者: 王印庚 (照片), 从事水产动物药理与疾病临床研究, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn



综合征 (white feces syndrome, WFS) 在对虾养殖区频发, 发病率高、传染性强, 给世界范围内对虾养殖业造成巨大经济损失^[5-6]。WFS 的典型症状主要包括虾塘表面漂浮有细长、白色略带黄色、有黏性、易腐败且有恶臭散发的棉线状虾便, 患病对虾表现出肝胰脏萎缩变小、后肠变白、肠内充满白色至金棕色物质以及甲壳松散等症状。

目前, 国内外关于对虾 WFS 发病症状、流行特点、病原病理、预防治疗以及对虾肠道微生物群落相关变化已有诸多报道^[7-10]。但目前对于 WFS 的病因仍存在认知不统一的问题, 当前研究主要集中在两种观点: 一种认为 WFS 是由病原菌感染引起的细菌性疾病, 并与天气突变、水质恶化、饵料霉变、蓝藻暴发、消化机能受损等外界因素相关, 现已报道的病原菌有霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、河流弧菌 (*V. fzuialis*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等^[11-12]。另一种认为 WFS 是由虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 感染引起^[13-14]。同时, 水生生物疾病的发生是由环境因子、病原微生物和宿主自身免疫能力综合作用的结果^[15]。养殖环境变化往往是疾病发生的诱因, 环境因子的变化影响病原体生存代谢及宿主的免疫力, 是病害发生发展的重要调控因素, 同时环境因子和生物因素的变化也会影响微生物群落结构组成变化^[16]。目前, 对于综合分析对虾 WFS 病原、宿主自身免疫力、水体环境菌群结构变化的研究还鲜有报道, 而在对虾养殖实践中, 整个养殖系统中的各种因子复杂多变, 所以从生产实践中进行 WFS 发生相关病因的研究更具有重要意义^[17]。

本研究以池塘养殖凡纳滨对虾为对象, 通过持续采集典型池塘养殖模式下的水质指标、可培养细菌、对虾机体免疫指标, 并结合宏基因组测序技术等分析方法, 综合解析对虾养殖生产实践中 WFS 发生前后的水体环境、微生物、虾体自身免疫能力和养殖水体菌群结构的变化情况, 深入分析 WFS 发生与各类因子的相互关系及其关联特性。相关研究结果为解析 WFS 的发生机制提供数据支撑和参考, 并为 WFS 的临床防控奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

本实验选取河北黄骅某池塘养殖的患有典型 WFS 的凡纳滨对虾进行持续性跟踪研究, 同步采

集同批次放苗且养殖管理条件相同的同场区内健康养殖池塘为对照。池塘面积均为 3.33 hm², 水深 1.3~1.5 m, 放苗密度为 30 尾/m²。实验池塘对虾为 75 日龄左右, 体长 (10±2) cm, 体重 (10.0±1.5) g, 每日早晚各投喂 1 次颗粒饲料, 投喂量为对虾体重的 3%; 患病池塘和健康池塘均未添加外源投入品; 采样频率为隔日 1 次, 健康组样品编号为 C1、C2、C3、C4 和 C5, 患病组样品编号为 D1、D2、D3、D4 和 D5。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利伦理和动物实验安全规范, 并按照中国水产科学研究院黄海水产研究所动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 样品采集

环境气候因子 每日上午 7:00 利用 YSI 水质检测仪对实验和健康虾池内 3 个位点的温度、盐度、pH、溶解氧等参数进行采集, 并对饵料投喂、进排水、外源投入品等信息加以调查记录, 同时依据中国气象网 (<http://www.cma.gov.cn/>) 公布的信息, 对实验区域内的天气、温度等信息进行观察记录。

水样采集 使用采水器分别取患病和健康对虾养殖池塘内 3 个不同位点的水样 2 L, 其中 1 L 水样使用无菌纱布过滤, 去除水中较大颗粒性杂质, 并经 0.22 μm 无菌纤维素滤膜抽滤后, 将滤膜冻存于 -80 °C 冰箱用于高通量测序分析, 剩余水样用于可培养细菌检测。

虾样采集 在患病和健康养殖池塘内的 3 个不同位点通过撒网随机捕捞对虾 30 尾, 测定对虾总重量, 并观察患病对虾比例。每个池塘随机选取 10 尾对虾置于塑料桶内, 充氧运输至实验室进行样品处理与分析。

1.3 虾体和水中可培养细菌检测

随机选取 5 尾鲜活凡纳滨对虾, 剪取约 0.2 g 对虾肝胰腺组织, 混匀后加入 500 μL 无菌 1.5% NaCl 溶液进行研磨, 向研磨均匀的肝胰腺组织匀浆内继续加入 4.5 mL 无菌 1.5% NaCl 溶液, 并通过 10 倍梯度稀释至 10⁻² 和 10⁻³, 吸取 100 μL 稀释液分别涂布于 TSB 和 TCBS 固体培养基内, 28 °C 培养 24 h 后观察记录并计算肝胰腺内可培养细菌和弧菌总量, 每个样品 3 组平行。吸取 100 μL 池水原液和 10 倍稀释液涂布于 TSB 和 TCBS 固体培养基内, 28 °C 培养 24 h 后观察记录并推算水体中可培养细菌和弧菌总量, 每个样品 3 组平行。

1.4 免疫酶活性检测

随机选取 5 尾鲜活凡纳滨对虾, 剪取 0.1 g 对虾肌肉组织, 混匀后加入 0.9 mL 无菌 0.9% NaCl 溶液进行冰水浴研磨, 将研磨均匀的组织匀浆置于 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 10 min 后取上清液。参照商品免疫酶活试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司) 测定方法对患病和健康养殖池塘对虾肌肉中的碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP)、溶菌酶 (LZM)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和酚氧化酶 (PO) 活性进行检测, 每个样品 3 组平行。

1.5 高通量测序分析

采用环境样本 DNA 提取纯化试剂盒 (FastDNA[®] Spin Kit for Soil, MP Biomedicals) 对 10 份水样滤膜总 DNA 进行提取, 以 16S *rDNA* 基因 V3~V4 可变区特异性引物进行扩增, 每份样品设立 3 个生物学重复, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 检测合格后纯化回收产物, 委托上海美吉生物医药科技有限公司, 使用 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台对检测合格的纯化回收产物进行建库测序分析。

1.6 数据分析

用 Mothur 结合 Excel 软件进行数据统计和分析, 并通过 SPSS 13.0 软件通过单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对数据进行分析, 使用 Duncan 氏检验进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用 QIIME 计算每个样本物种的 α 多样性指数和门属水平的相对丰度图, 基于 Bray-Curtis 非相似性进行主坐标分析 (principal coordinates analysis,

PCoA), 使用 R 语言 vegan 包中冗余分析 (RDA 分析) 和作图。

2 结果

2.1 养殖池塘环境理化因子变化分析

患病组和健康组池塘环境理化因子波动趋势相似, 健康组气温、水温、DO、pH 和盐度波动范围分别为 23.0~27.0 °C、26.4~29.0 °C、4.26~5.56 mg/L、8.39~8.73、40~43。患病组气温、水温、DO、pH 和盐度波动范围分别为 23.0~27.0 °C、26.1~28.7 °C、5.1~6.08 mg/L、8.41~8.67、44~49。其中患病组 DO 和盐度比健康组高, 水温和 pH 差异不大 (表 1)。

2.2 虾体和水中可培养细菌变化分析

通过对虾体和水中可培养细菌含量进行统计分析, 发现健康组对虾肝胰腺内可培养细菌和弧菌含量分别为 $1.19 \times 10^5 \sim 7.70 \times 10^5$ 和 $8.80 \times 10^3 \sim 1.96 \times 10^4$ CFU/g, 弧菌占比 2%~16%, 弧菌占比处于较低水平。水体可培养细菌和弧菌含量为 $5.00 \times 10^4 \sim 5.50 \times 10^4$ CFU/mL 和 $1.70 \sim 4.10 \times 10^3$ CFU/mL, 弧菌占比 5%~34% (表 2)。

与健康组相比, 患病组池塘凡纳滨对虾肝胰腺内可培养细菌、弧菌含量及占比普遍较高, 数量分别为 $3.80 \times 10^5 \sim 2.51 \times 10^6$ CFU/g 和 $2.02 \times 10^5 \sim 1.49 \times 10^6$ CFU/g, 弧菌占比 55%~70%, 患病组虾体肝胰腺内弧菌数量比健康组高出 1~2 个数量级 (15~113 倍); 水体可培养细菌和弧菌含量分别为 $3.40 \times 10^3 \sim 6.7 \times 10^4$ CFU/mL 和 $1.00 \times 10^3 \sim 5.00 \times 10^3$

表 1 健康组和患 WFS 组池塘环境理化因子检测信息表

Tab. 1 Physical and chemical environment information of WFS pond and control pond

组别 groups	样品 samples	气温/°C air temperature	水温/°C water temperature	溶解氧/(mg/L) dissolved oxygen	pH pH value	盐度 salinity
健康组 healthy group	C1	27	29.0	4.26	8.53	40
	C2	23	26.4	4.91	8.45	43
	C3	26	27.2	5.56	8.73	41
	C4	26	26.9	4.36	8.39	42
	C5	27	28.3	4.45	8.51	40
患病组 diseased group	D1	27	28.2	6.08	8.41	45
	D2	23	26.1	5.88	8.49	49
	D3	26	26.6	5.6	8.66	46
	D4	26	27.1	6.01	8.43	44
	D5	27	28.7	5.1	8.67	46

表 2 水体和虾体肝胰腺组织中可培养微生物检测信息表

Tab. 2 Culturable bacteria information in pond water and shrimp hepatopancreas

组别 groups	样品 samples	虾体 shrimp			水体 water		
		细菌总量/(CFU/g) total bacteria no.	弧菌总量/(CFU/g) total <i>Vibrio</i> no.	弧菌占比/% <i>Vibrio</i> proportion	细菌总量/(CFU/mL) total bacteria no.	弧菌总量/(CFU/mL) total <i>Vibrio</i> no.	弧菌占比/% <i>Vibrio</i> proportion
健康组 healthy group	C1	1.19×10 ⁵	1.96×10 ⁴	16	5.00×10 ³	1.70×10 ³	34
	C2	3.17×10 ⁵	8.80×10 ³	3	3.20×10 ⁴	2.50×10 ³	8
	C3	5.30×10 ⁵	1.45×10 ⁴	3	8.70×10 ³	2.10×10 ³	24
	C4	5.72×10 ⁵	1.87×10 ⁴	3	3.23×10 ⁴	4.10×10 ³	13
	C5	7.70×10 ⁵	1.30×10 ⁴	2	5.50×10 ⁴	2.50×10 ³	5
患病组 diseased group	D1	8.93×10 ⁵	3.20×10 ⁵	36	3.40×10 ³	1.50×10 ³	44
	D2	4.23×10 ⁵	2.02×10 ⁵	48	6.00×10 ³	1.00×10 ³	17
	D3	3.80×10 ⁵	2.59×10 ⁵	70	7.50×10 ³	5.00×10 ³	67
	D4	2.15×10 ⁶	7.52×10 ⁵	35	6.70×10 ⁴	1.40×10 ³	2
	D5	2.51×10 ⁶	1.49×10 ⁶	59	1.80×10 ⁴	1.60×10 ³	9

CFU/mL, 弧菌占比为 2%~67%, 在可培养细菌含量和弧菌占比方面与健康组间未形成数量级别差异。

2.3 免疫酶活性变化分析

凡纳滨对虾免疫酶活性分析表明, AKP、ACP、LZM、SOD 和 PO 等 5 种免疫酶活性的变化范围在健康组分别为 1.21~5.64、9.17~15.25、3.56~7.43、4.83~6.70 及 3.10~4.55 U/mg。在患病组分别为 2.12~5.39、19.22~26.96、19.73~26.85、3.00~4.14 及 7.76~9.21 U/mg。两组之间的 ACP、LZM 和 PO 等 3 种酶活性差异较大, 同一天采样测试结果对比, 患病组比健康组高出 1~5 倍; AKP、SOD 等 2 种酶活性差异不大, 波动幅度较小。结合凡纳滨对虾健康状况分析表明, 凡纳滨对虾机体 ACP、LZM、PO 与 WFS 发生的相关性较强 (表 3)。

2.4 高通量测序结果

通过对实验周期内健康组 (C1、C2、C3、C4、C5), 患病组 (D1、D2、D3、D4、D5) 共 10 组样品进行高通量测序, 获得的样本原始序列总数为 1 695 662, 为避免由于测序深度不同造成的偏差, 每个样品随机选取, 均一化至 34 423 条有效序列进行后续分析, 经质控和优化后共得到 1 032 690 条有效序列。将一致性在 97% 以上的序列聚类成一个分类操作单位 (OTU), 共获得 1 877 个 OTUs。10 组样品的 OTU 数量范围为 684~810 个, 其中健康组和实验组共有 OTU 254 个, 特有 OTU 为 41、34、43、41、62 和 82、54、38、90、56 个。

对 10 组样品的 OTU 进行物种注释, 构建 α 多样性指数的稀释曲线图和指数图 (图 1), 分析可知, 随着测序序列的增加, 序列所对应样本的

表 3 凡纳滨对虾肌肉组织免疫酶活性检测信息表

Tab. 3 Immune enzyme activity in muscle of *L. vannamei*

组别 groups	样品 samples	AKP	ACP	LZM	SOD	PO	U/mg
健康组 healthy group	C1	5.64±0.63	11.43±1.04	6.33±0.74	4.83±0.50	4.06±0.18	
	C2	3.91±0.45	15.25±2.10	3.56±0.08	5.82±0.39	3.10±0.35	
	C3	4.57±0.57	11.29±0.95	6.71±0.43	4.80±0.28	3.94±0.41	
	C4	1.21±0.09	10.53±1.03	4.83±0.62	6.70±0.85	4.55±0.27	
	C5	4.44±0.18	9.17±0.64	7.43±0.18	5.26±0.63	3.42±0.52	
患病组 diseased group	D1	2.12±0.04	19.22±2.05	21.28±1.65	4.14±0.38	8.21±0.73	
	D2	4.90±0.32	26.02±3.52	19.73±1.42	3.00±0.23	9.21±0.85	
	D3	2.15±0.15	22.16±2.86	26.05±2.68	3.23±0.18	8.21±0.82	
	D4	5.39±0.68	20.89±2.42	26.85±1.79	3.95±0.42	8.77±0.69	
	D5	2.57±0.22	26.96±1.95	25.27±3.02	4.05±0.27	7.76±0.35	

Shannon 多样性指数曲线逐渐趋于平缓。样本测序覆盖率均在 99.3% 上, 表明样品中序列未被检

测的概率极低, 测序数据合理充分, 有效测序数量已经能够较好地覆盖菌群多样性 (表 4)。

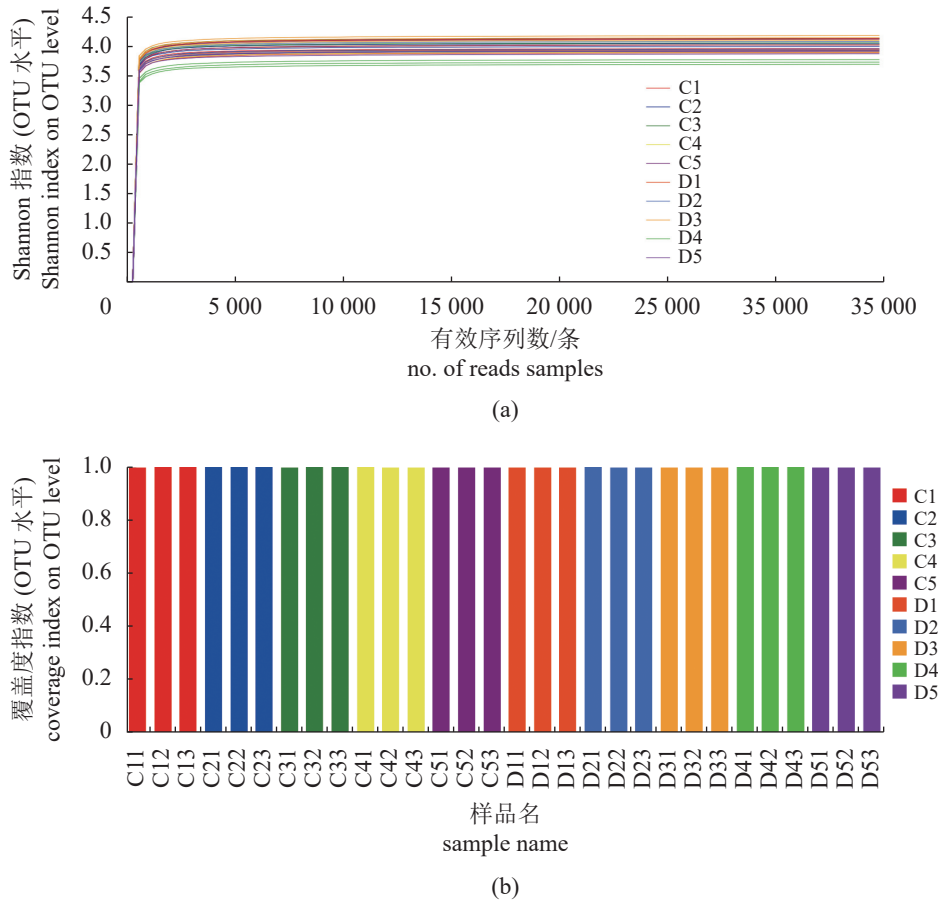


图 1 水体微生物在 OTU 水平的 Shannon 稀释曲线 (a) 和 Coverage 指数图 (b)

Fig. 1 Shannon dilution curve (a) and Coverage dilution index (b) at OTU level

2.5 白便综合征发生与水体微生物群落 α 多样性变化分析

α 多样性指数分析表明, Ace、Chao、Shannon 和 Simpson 指数在健康组分别为 811.05~913.72、727.32~881.81、3.98~4.08 和 0.036~0.046; 在患病组分别为 752.37~1066.23、723.14~893.59、3.71~4.88 和 0.034~0.064 (表 4)。健康组池塘水体中微生物群落丰富度指数 Ace 和 Chao 随时间变化整体呈升高的趋势 ($P < 0.05$); 患病组池塘水体中群落丰富度指数 Ace 和 Chao 指数波动幅度较大, 整体呈下降趋势 ($P < 0.05$), 且数值多高于健康组。

健康组池塘水体中有关微生物群落多样性指数 Shannon 随时间呈现一定升高趋势, Simpson 指数无显著差异 ($P > 0.05$); 患病组中 Shannon 指数和 Simpson 指数波动幅度较明显, 均表现差异显著 ($P < 0.05$), 且 Shannon 指数数值多低于健康组, Simpson 指数多高于健康组。

基于 Bray Curtis 法在 OTU 水平上对 10 组样品间的群落差异进行主成分分析 (PCoA)。结果显示, 所有细菌群落主要沿第一轴分布, 健康组和患病组的细菌群落结构差异明显, 按照健康状况聚类, 2 个主坐标分别解释 43.21% 和 21.4% 的群落差异。健康组内样品 (C1~C5) 之间距离均相距较近, 但和患病组间相距较远, 表明组内样品之间群落组成较相似, 组间群落组成差异性较大; 患病组内样品 (D1~D5) 菌群结构离散程度随着疾病的发生逐渐拉大。此外, 每个样品的 3 个平行之间距离相近, 群落结构相似, 表明每个样品的重复性足够好, 能够充分支撑样品中微生物群落的相关分析结果 (图 2)。

2.6 白便综合征发生与水体微生物群落结构组成变化分析

通过对 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台所

表 4 水体微生物的 α 多样性指数分析

Tab. 4 α - diversity index of microorganisms in pond water

组别 groups	样品 samples	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index	Ace指数 Ace index	Chao指数 Chao index	覆盖度/% coverage
健康组 healthy group	C1	3.98±0.09 ^b	0.040±0.004 ^a	811.05±136.72 ^b	750.45±64.97 ^{ab}	99.53±0.05 ^a
	C2	3.98±0.05 ^b	0.039±0.002 ^a	816.04±21.48 ^a	727.32±43.60 ^b	99.54±0.02 ^a
	C3	4.08±0.04 ^a	0.036±0.002 ^a	913.72±74.74 ^b	807.24±44.12 ^{ab}	99.48±0.03 ^{ab}
	C4	3.98±0.09 ^{ab}	0.046±0.008 ^a	874.93±125.59 ^a	824.01±75.22 ^{ab}	99.48±0.04 ^{ab}
	C5	4.07±0.06 ^{ab}	0.040±0.006 ^a	895.34±108.89 ^a	881.81±50.22 ^a	99.44±0.01 ^b
患病组 diseased group	D1	3.96±0.12 ^b	0.045±0.006 ^b	1066.23±132.65 ^a	893.59±41.74 ^a	99.39±0.06 ^a
	D2	3.97±0.08 ^b	0.044±0.006 ^b	885.67±137.81 ^{ab}	791.59±72.91 ^{ab}	99.46±0.05 ^{ab}
	D3	4.12±0.04 ^a	0.034±0.002 ^c	983.81±49.05 ^a	827.74±33.53 ^a	99.44±0.03 ^a
	D4	3.71±0.04 ^c	0.064±0.004 ^a	752.37±87.66 ^b	723.14±45.20 ^b	99.53±0.03 ^b
	D5	3.88±0.03 ^b	0.050±0.005 ^b	984.24±73.08 ^a	839.29±30.85 ^a	99.42±0.03 ^a

注: 池塘同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。
Notes: Small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

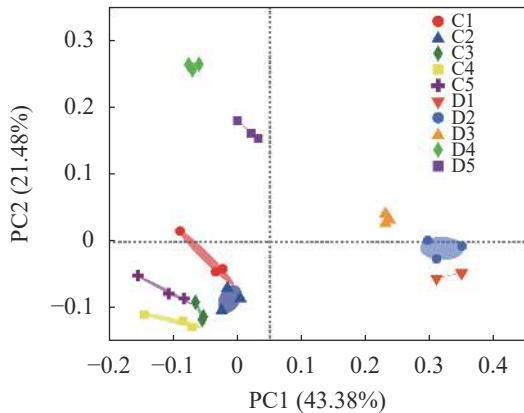


图 2 水体微生物群落结构的主坐标分析 (PCoA, 基于 Bray-Curtis 距离)

Fig. 2 Principal coordinate analysis of microbial community structure (PCoA, based on Bray Curtis distance)

得有效序列在不同分类水平上进行物种注释和统计分析, 所得有效数据共注释到 35 门 609 个属 (图 3)。在门水平上 (相对丰度>0.2%), 健康和患病水体中主要菌群为放线菌门 (Actinomycetota)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、蓝藻门 (Cyanobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria), 其相对丰度在健康组分别为 32.59%~40.42%、17.28%~29.25%、17.13%~26.71% 和 11.87%~14.49%; 在患病组分别为 25.97%~50.33%、14.75%~32.38%、7.50%~32.03% 和 13.55%~20.28%。随着患病周期延长, 患病组中放线菌门、变形菌门相对丰度显著降低 ($P<0.05$), 拟杆菌门、蓝藻门相对丰度显著升高 ($P<0.05$), γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 无显著变化。健康组中菌群结构整体在门水平相对丰

度均未有显著差异 ($P>0.05$), 其中 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 含量显著高于患病组 (表 5)。

在属、科水平上, 10 组中排名较高的优势菌群为聚球藻菌属 (*Synechococcus*)、脞基降解菌科 (Nitriliruptoraceae)、PeM15、腐败螺旋菌科 (Saprosiraceae)、DS001、巴纽尔斯菌科 (Balneolaceae)、Llumatobacteraceae、蓝藻属 (*Cyanobium*)、微杆菌科 (Microbacteriaceae)。其中患病组中聚球藻属、PeM15、腐螺菌科 (Saprosiraceae)、巴纽尔斯菌科、蓝藻属显著降低, DS001、Llumatobacteraceae 和微杆菌科 (Microbacteriaceae) 相对丰度显著升高, 脞基降解菌科无显著变化; 健康组中脞基降解菌科、DS001、微杆菌科相对丰度显著降低, 其他菌群无显著变化 (表 5)。

2.7 水体微生物菌群组成与环境因子和生物因子的 RDA 分析

为了探究水体微生物群落组成与生物因子及非生物因子之间的关系, 对微生物群落组成进行降维对应分析 (DCA), 发现第 1 轴长度梯度为 1.380 1, 小于 3, 特征值为 0.179 2, 因此选用线性模型冗余分析 (RDA 分析)。采用 Monte Carlo 置换检验, 即用 permutest 函数对 T、DO、pH、盐度 (Sat)、虾体细菌 (SB)、虾体弧菌 (SV)、水体细菌 (WB)、水体弧菌 (WV) 等 8 个因子进行分析, 共筛选出 DO、Sat、SB、SV、WB 等 5 个具有显著解释性的环境因子 ($P<0.05$)。

RDA 分析结果显示, 轴 1 和轴 2 的解释贡献率分别为 43.00% 和 15.95%, 共累计解释了样本

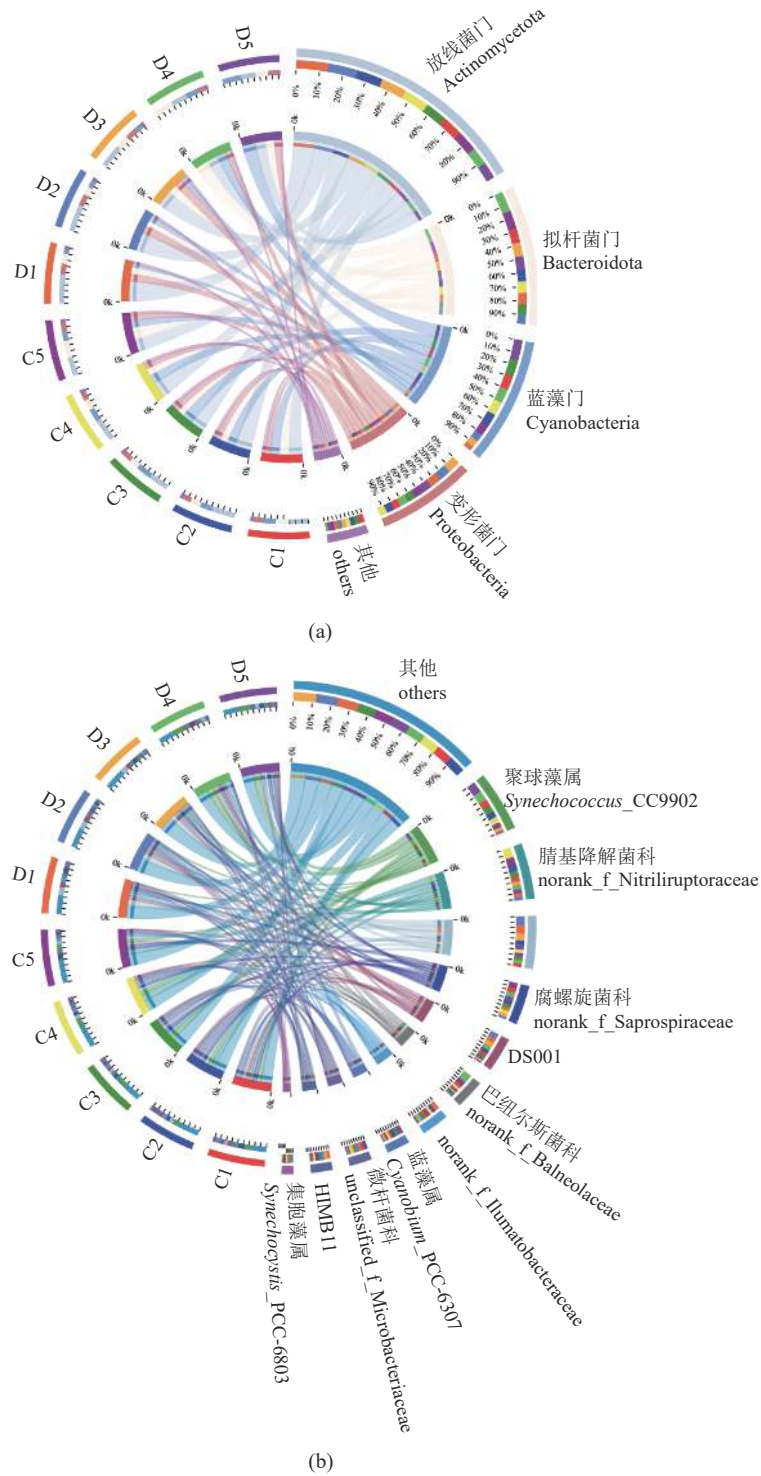


图 3 水体微生物群落结构组成在门 (a) 和属 (b) 分类水平上的 Circos 图

小半圆 (左半圆) 表示样本中物种组成情况, 外层彩带的颜色代表的是来自某一分组, 内层彩带的颜色代表物种, 长度代表该物种在对应样本中的相对丰度; 大半圆 (右半圆) 表示该分类学水平下物种在不同样本中的分布比例情况, 外层彩带代表物种, 内层彩带颜色代表不同分组, 长度代表该样本在某一物种中的分布比例。

Fig. 3 Circos diagram of microbial community structure at phylum and genus levels

The small semicircle (left semicircle) represents the species composition, the outer ribbon represents the grouping, the inner ribbon represents the species, the length represents the relative abundance of the species in the corresponding sample; the large semicircle (right semicircle) represents the distribution proportion of species in different samples at the taxonomic level, and the outer ribbon represents the species, the inner ribbon represents different groups, and the length represents the distribution proportion of the sample in a species.

表 5 池塘水体微生物群落在门和科、属水平上的相对丰度信息

Tab. 5 Relative abundance information of microbial community at phylum, family and genus level in ponds %

水平 level	项目 items	健康组 healthy groups					患病组 diseased groups				
		C1	C2	C3	C4	C5	D1	D2	D3	D4	D5
门 phylum	放线菌门 Actinomycetota	32.94±4.76 ^b	40.42±1.20 ^a	34.31±1.01 ^{ab}	40.00±0.62 ^a	32.59±2.30 ^b	50.33±4.84 ^a	46.42±4.69 ^{ab}	40.21±1.07 ^b	27.7±1.55 ^c	25.97±3.12 ^c
	拟杆菌门 Bacteroidota	23.15±2.49 ^{ab}	18.68±2.96 ^b	17.28±1.28 ^b	18.54±2.68 ^b	29.25±3.47 ^a	17.51±2.44 ^{bc}	14.75±1.39 ^a	21.83±1.71 ^b	32.38±2.18 ^a	21.49±0.54 ^b
	蓝藻门 Cyanobacteria	23.13±6.89 ^a	21.12±2.89 ^a	26.71±2.80 ^a	21.93±1.92 ^a	17.13±0.66 ^c	7.50±1.82 ^a	11.909±6.22 ^a	10.68±0.87 ^a	22.26±3.97 ^b	32.02±3.20 ^a
	变形菌门 Proteobacteria	12.10±1.13 ^a	12.04±0.91 ^a	13.84±1.02 ^a	11.87±1.67 ^a	14.49±4.83 ^a	18.03±4.03 ^b	19.91±2.98 ^a	20.28±0.39 ^a	13.55±1.17 ^a	15.94±0.53 ^b
	Patescibacteria	1.10±0.25 ^a	1.49±0.48 ^a	1.77±0.11 ^a	1.84±0.09 ^a	1.66±0.51 ^a	1.15±0.13 ^{ab}	1.89±0.15 ^a	1.91±0.24 ^a	0.38±0.09 ^b	1.16±0.15 ^{ab}
科、属 family, genus	聚球藻属 <i>Synechococcus</i>	12.52±3.99 ^a	11.07±1.49 ^a	12.02±1.13 ^a	11.03±1.13 ^a	8.74±0.17 ^a	2.07±0.50 ^b	3.10±1.67 ^b	5.46±0.65 ^b	17.47±2.79 ^a	19.38±2.33 ^a
	腓基降解菌科 Nitrilriuptoraceae	8.44±1.04 ^c	11.32±0.94 ^{bc}	10.97±0.86 ^b	18.00±2.73 ^a	13.48±1.3 ^b	6.35±0.67 ^a	6.20±0.39 ^a	7.23±0.35 ^a	7.17±0.57 ^a	7.12±1.35 ^a
	PeM15	6.13±1.24 ^a	8.01±1.71 ^a	6.21±0.58 ^a	7.02±1.5 ^a	6.38±0.43 ^a	15.45±1.89 ^a	15.73±2.01 ^a	12.73±0.34 ^a	6.20±0.13 ^b	7.92±1.17 ^b
	腐螺菌科 Saprospiraceae	9.49±1.57 ^a	6.90±0.74 ^b	6.56±0.66 ^b	5.79±0.36 ^b	9.73±0.95 ^a	5.91±0.88 ^{bc}	4.26±0.43 ^a	5.74±0.72 ^{bc}	8.38±0.97 ^a	7.37±0.10 ^{ab}
	DS001	6.26±1.02 ^a	6.43±0.26 ^a	5.26±0.22 ^a	3.23±0.28 ^b	2.18±0.24 ^b	9.41±1.09 ^a	10.00±1.77 ^a	8.04±0.36 ^a	7.50±0.57 ^a	4.20±0.46 ^b
	巴组尔菌科 Balneolaceae	6.78±0.70 ^{ab}	3.24±0.79 ^b	2.51±0.12 ^b	5.13±1.85 ^{ab}	9.46±2.95 ^a	1.40±0.19 ^a	1.42±0.22 ^a	3.72±0.44 ^a	15.6±1.25 ^a	4.68±0.28 ^b
	Ilumatobacteraceae	5.02±0.72 ^b	6.87±0.14 ^a	4.99±0.14 ^b	5.66±0.24 ^b	5.16±0.60 ^b	8.39±0.69 ^a	4.49±0.40 ^b	4.09±0.12 ^b	3.09±0.19 ^c	2.90±0.39 ^c
	蓝藻属 <i>Cyanobium</i>	5.39±1.67 ^a	6.11±0.96 ^a	6.30±0.69 ^a	5.02±0.59 ^a	4.69±0.30 ^a	1.80±0.45 ^{bc}	1.89±1.06 ^{bc}	3.01±0.77 ^b	0.30±0.05 ^{bc}	9.44±0.30 ^a
	微杆菌科 Microbacteriaceae	5.52±0.75 ^a	5.66±0.32 ^a	4.88±0.32 ^{ab}	3.79±0.36 ^b	2.89±0.35 ^b	5.44±0.50 ^a	5.35±0.45 ^{ab}	4.47±0.25 ^b	2.49±0.21 ^c	2.34±0.19 ^c

注: 患病组和健康组的池塘同行数据肩标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。Notes: Small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

微生物群落空间分异的 58.95%。与轴 1 相关性较强的因子主要有 WB、Sat, 其相关系数分别为 -0.999 6 和 0.761 0, 而与轴 2 相关性较强的因子为 SV、SB、DO, 相关系数分别为 0.972 8、0.855 1 和 0.716 8。患病组 D1、D2、D3 水体样本群落分布与 DO、Sat 呈显著正相关, 主要是 OTU1213 和 OTU336 丰度分布受到影响; 患病组 D4、D5 与 SV、SB、WB 呈显著正相关, 主要是 OTU630 丰度分布受到影响。健康组水体样本主要是 OTU59 丰度分布受 WB 显著影响, 进而影响水体微生物群落分布 (图 4)。RDA 分析结果显示, 轴 1 和轴 2 共累计解释了微生物门类群落空间分异的 61.03%。放线菌门和变形菌门类群与 DO、Sat 呈显著正相关, 拟杆菌门和蓝藻门类群与 SV、SB、WB 呈显著正相关 (图 4)。

3 讨论

水体中的 pH、DO、温度、盐度等环境因子

对虾类生长、发育、繁殖有着重要的调控作用^[18]。研究表明, WFS 的发生与天气突变、养殖水质和底质恶化有较大的关系^[19]。但本研究发现, 凡纳滨对虾池塘养殖模式下患病组与健康组池塘内 pH、DO、温度、盐度波动趋势相似, 水温和 pH 区别不大, 只有 DO 和盐度比健康组高。自然环境中 pH、DO、温度、盐度受环境气候和水源情况的影响较大, 由 WFS 发生导致的环境因子的变化可能被弱化, 进而未检测出明显的环境理化因子差异。对虾体内和养殖水体的细菌变化特别是弧菌丰度的增加是导致对虾病害暴发的主要原因之一。弧菌大量扩增及环境恶化是导致 WFS 发生的重要原因^[7]。本研究发现, 患病组对虾肝胰腺内可培养细菌和弧菌总量普遍比健康组高, 其中弧菌数量比健康组高 15~113 倍, 符合对虾 WFS 的病原为弧菌的特征。AKP、LZM、ACP、SOD、PO 等非特异性免疫酶活性常被用作衡量凡纳滨对虾免疫能力的重要指标^[20]。多项研究表明, 对虾机体免疫酶活性会在外界环境因子、病原因子的作用下

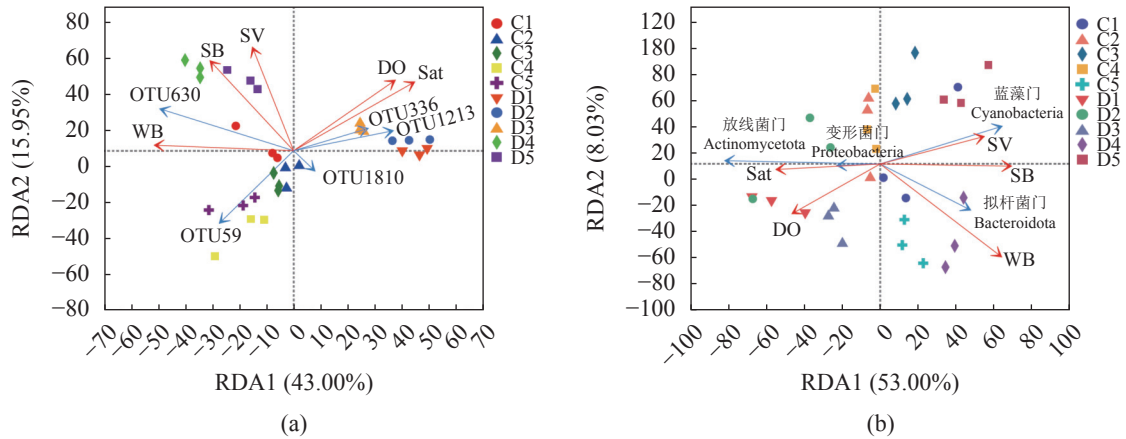


图 4 基于不同水平的水体微生物群落组成与环境因子的 RDA 分析

(a) OTU 水平的 RDA 分析, (b) 门水平的 RDA 分析; 红色箭头表示影响因素, 蓝色箭头表示优势 OTU 或门类群。

Fig. 4 RDA analysis of microbial community composition and environmental factors

(a) RDA on OTU level, (b) RDA on phylum level; the red arrows indicate the influencing factors, and the green arrow indicates the dominant OTU group or phylum group.

发生变化^[21-23]。本研究表明, 患病组对虾肌肉的 ACP、LZM、PO 等 3 种酶活性明显高于健康组, 而 AKP、SOD 等 2 种酶活性在两组间差异性不大, 波动幅度也较小。说明病原等外界刺激可能会调动机体自身的免疫酶活性而产生一定的免疫保护反应。

菌群结构组成与多样性很大程度上影响着养殖动物健康, 已有研究发现, Ace、Chao 和 Shannon 指数越高, Simpson 指数越低, 菌群丰度和多样性越高^[24-25]。疾病发生后, 稳定的微生物群落结构被改变, 多样性降低^[26]。吴金凤等^[27]通过对凡纳滨肠道及其水体微生物多样性研究表明, 患病对虾肠道多样性均低于健康组, 且差异显著。本研究结果表明, 患病组 Shannon 指数数值多低于健康组, Simpson 指数多高于健康组, 但差异不明显, 这和郁维娜等^[28]关于患病对虾肠道多样性均低于健康组但差异不显著的研究结果一致。健康组池塘水体中 Ace、Chao、Shannon 指数随时间变化整体呈升高的趋势 ($P<0.05$), 患病组中则呈降低趋势, 且患病组池塘水体中 Ace、Chao 指数在患病初期的数值多高于健康组, 分析原因可能是患病池塘初始的水体微生物群落多样性高于健康组, 但随着 WFS 的持续, 整体呈下降趋势。物种注释和统计分析结果表明, 水体菌群组成在健康组和患病组池塘水体中优势种类相同, 但组成比例变化存在显著差异。与健康组池塘水体细菌组成相比, 患病组中放线菌门、变形菌门相对丰度降低, 拟杆菌门、蓝藻门相对丰度显著升高

($P<0.05$)。健康组中菌群结构整体在门水平的相对丰度均未有显著差异 ($P>0.05$)。Xue 等^[29]通过研究凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征发现, 苗池水体菌群主要以变形菌门和拟杆菌门、放线菌门为主。黄雪敏等^[30]通过对健康与发病对虾池水中菌群结构比较发现, 发病池水中放线菌门丰度显著低于健康池水。李卢国等^[31]和吴越等^[32]通过对水体微生物菌群分析发现, 关于养殖水体的好坏与变形菌门菌群丰度存在正相关, 表明水体菌群结构组成变化特征对对虾 WFS 发生具有一定的指示作用。

水体微生物的群落结构组成与水质环境因子和生物因素的变化密不可分^[33]。闫苏苏等^[34]通过对长寿湖浮游植物功能群季节变化与环境因子的关系研究发现, 透明度、水温、电导率、光照强度、溶解氧和总氮是影响长寿湖浮游植物功能群变化的主要环境因子, 郑诚等^[35]通过对四明湖浮游植物群落结构的季节演替规律研究发现, 水温、透明度、硝态氮、浮游植物生物量是影响浮游植物群落结构动态变化的主要因子, Yang 等^[36]通过探讨营养富集对浮游细菌群落组成和稳定性的影响研究表明, 对虾养殖过程中营养物质的富集改变可以破坏群落的稳定性。为探讨水体微生物群落组成与生物因子及非生物因子之间的关系, 本研究通过对微生物群落组成和环境因子进行 RDA 关联分析并采用蒙特卡洛置换进行显著性检验, 结果显示, 溶解氧、盐度、虾体细菌、虾体弧菌、水体细菌是影响患病对虾池塘水体中菌群结构组

成的显著因子, 溶解氧、盐度的变化影响放线菌门和变形菌门类群数量, 虾体细菌、虾体弧菌和水体细菌的变化影响拟杆菌门和蓝藻门类群数量, 且随着病害的持续, 水体和虾体中的病原菌因子会超越环境因子成为水体微生物菌群结构组成的主导影响因子。

综上所述, 本研究通过系统解析对虾 WFS 发生后水质理化因子、虾体和水中可培养微生物、虾体自身免疫力及水体菌群结构变化情况, 首次从环境因子、微生物和宿主免疫反应的角度结合宏基因组测序手段对池塘养殖环境下对虾 WFS 的发生进行系统性分析。研究表明, 弧菌大量扩增是导致此次对虾 WFS 发生的主要致病因素, 同时病害的发生会调动机体自身 ACP、LZM、PO 等免疫酶活性升高, 进而产生免疫保护效应, 高通量测序分析表明, 水体微生物群落结构组成与多样性存在显著差异, 且与溶解氧、盐度、水体和虾体中病原菌的相关性较强。相关研究结果对深入了解池塘养殖模式下对虾 WFS 的发生与环境、病原和机体免疫间的相互关系, 建立疾病综合诊疗技术提供理论支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 藤达, 高维新, 李雪. 全球对虾产业发展现状及出口竞争力提升对策[J]. 世界农业, 2014(10): 106-112.
Teng D, Gao W X, Li X. Analysis on global production and trade characteristics of shrimp[J]. World Agriculture, 2014(10): 106-112 (in Chinese).
- [2] Soto-Rodriguez S A, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, et al. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(5): 1689-1699.
- [3] Rajendran K V, Shivam S, Praveena P E, et al. Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India[J]. Aquaculture, 2016, 454: 272-280.
- [4] 贾睿, 朱婵, 庄旻敏, 等. 白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19及VP28的研究进展[J]. 水产学报, 2020, 44(5): 870-880.
Jia R, Zhu C, Zhuang M M, et al. Review of research progress on white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP19 and VP28[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(5): 870-880 (in Chinese).
- [5] Kumar T S, Makesh M, Alavandi S V, et al. Clinical manifestations of White feces syndrome (WFS), and its association with *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* grow-out farms: a pathobiological investigation[J]. Aquaculture, 2022, 547: 737463.
- [6] Lu J Q, Zhang X C, Qiu Q F, et al. Identifying potential polymicrobial pathogens: moving beyond differential abundance to driver taxa[J]. Microbial Ecology, 2020, 80(2): 447-458.
- [7] Wang H L, Wan X Y, Xie G S, et al. Insights into the histopathology and microbiome of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, suffering from white feces syndrome[J]. Aquaculture, 2020, 527: 735447.
- [8] Palanikumar P, Wahjuningrum D, Abinaya P, et al. Usage of plant natural products for prevention and control of white feces syndrome (WFS) in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* farming in India[J]. Aquaculture International, 2020, 28(1): 113-125.
- [9] Zeng S Z, Zhou R J, Bao S C, et al. Identification of multigene biomarker for shrimp white feces syndrome by full-length transcriptome sequencing[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 71.
- [10] Hou D W, Huang Z J, Zeng S Z, et al. Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(8): 3701-3709.
- [11] Cao H P, Wen L F, He S, et al. *Vibrio cholerae*: a causal agent for white feces syndrome in freshwater cultured whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh, 2015, 67: 1-7.
- [12] 曹海鹏, 温乐夫, 周桂娟, 等. 南美白对虾白便综合征病原霍乱弧菌的分离与药敏试验[J]. 动物医学进展, 2016, 37(2): 128-132.
Cao H P, Wen L F, Zhou G X, et al. Isolation and antimicrobial sensitivity test of a *Vibrio cholerae* strain from *Penaeus vannamei* with white fecal syndrome[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(2): 128-132 (in Chinese).
- [13] Tang K F J, Han J E, Aranguren L F, et al. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140: 1-7.
- [14] Caro L F A, Mai H N, Pichardo O, *et al.* Evidences supporting *Enterocytozoon hepatopenaei* association with white feces syndrome in farmed *Penaeus vannamei* in Venezuela and Indonesia[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2020, 141: 71-78.
- [15] 宋林生. 海水养殖贝类病害预警预报技术及其应用[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(1): 1-9.
- Song L S. An early warning system for diseases during mollusc mariculture: exploration and utilization[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 1-9 (in Chinese).
- [16] Blancheton J P, Attramadal K J K, Michaud L, *et al.* Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication[J]. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 30-39.
- [17] Huang Z J, Zeng S Z, Xiong J B, *et al.* Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 32.
- [18] 贾旭颖. 淡水养殖凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 对环境胁迫的生理生态响应 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Jia X Y. The ecophysiological responses of *Litopenaeus vannamei* under freshwater condition to environmental stresses[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [19] Xiong J B, Zhu J L, Wang K, *et al.* The temporal scaling of bacterioplankton composition: high turnover and predictability during shrimp cultivation[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(2): 256-264.
- [20] Rengpipat S, Tunyanun A, Fast A W, *et al.* Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(2): 169-173.
- [21] Pan Z C, He J G, Weng S P, *et al.* Changes in mortality and immunological variables of *Litopenaeus vannamei* parents and their filial families infected with white spot syndrome under different experimental conditions[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 459-471.
- [22] 王芸, 李健, 陈萍, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫功能的影响[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(29): 109-114.
- Wang Y, Li J, Chen P, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on growth performance and nonspecific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(29): 109-114 (in Chinese).
- [23] 姜燕. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病防治中草药的筛选 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- Jiang Y. *In vitro* bacteriostatis Chinese herb compound selection for acute hepatopancreas necrosis syndrome in *Litopenaeus vannamei*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [24] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 134-139.
- Li C, Kong X X, Yu J B, *et al.* Analysis of microbial community diversity of crab paste by high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2020, 41(4): 134-139 (in Chinese).
- [25] Ying C W, Chang M J, Chang Y T, *et al.* Photosynthetic bacteria enhanced water quality and integrity of microbial community composition of integrated multitrophic aquaculture system of milkfish *Chanos chanos* coastal farming[J]. *Fisheries Science*, 2020, 86(2): 329-338.
- [26] 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.
- [27] 吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(2): 611-621.
- Wu J F, Xiong J B, Wang X, *et al.* Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(2): 611-621 (in Chinese).
- [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] Xue M, Liang H F, He Y Y, *et al.* Characterization and *in vivo* evaluation of potential probiotics of the bacterial

- flora within the water column of a healthy shrimp larviculture system[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(3): 484-491.
- [30] 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).
- [31] 李卢国, 骆云慧, 徐善良. 循环水养殖黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)水体中循环率对水质因子和细菌群落多样性的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(2): 318-327.
Li L G, Luo Y H, Xu S L. Effects of flow rate on water quality factors and microbial community in recirculating aquaculture system for *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(2): 318-327 (in Chinese).
- [32] 吴越, 马建忠, 郑伊诺, 等. 石斑鱼循环水养殖系统微生物群落结构[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1045-1054.
Wu Y, Ma J Z, Zheng Y N, *et al.* Analysis of microbial community structure in recirculating aquaculture system for groupers (*Epinephelus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1045-1054 (in Chinese).
- [33] 杨坤杰, 王欣, 熊金波, 等. 健康和患病凡纳滨对虾幼虾消化道菌群结构的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1765-1773.
Yang K J, Wang X, Xiong J B, *et al.* Comparison of the bacterial community structures between healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive tract[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(11): 1765-1773 (in Chinese).
- [34] 闫苏苏, 雷波, 刘朔孺, 等. 长寿湖浮游植物功能群季节变化及影响因子[J]. *水生态学杂志*, 2018, 39(3): 52-60.
Yan S S, Lei B, Liu S R, *et al.* Seasonal variation of phytoplankton functional groups in Changshou Lake and relevant environmental factors[J]. *Journal of Hydroecology*, 2018, 39(3): 52-60 (in Chinese).
- [35] 郑诚, 陆开宏, 徐镇, 等. 四明湖水库浮游植物功能类群的季节演替及其影响因子[J]. *环境科学*, 2018, 39(6): 2688-2697.
Zheng C, Lu K H, Xu Z, *et al.* Seasonal succession of phytoplankton functional groups and their driving factors in the Siminghu reservoir[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(6): 2688-2697 (in Chinese).
- [36] 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.

Correlation analysis of white feces syndrome (WFS) of *Litopenaeus vannamei* with host immunity, environment factors and microbial community

WANG Yingeng^{1*}, YU Yongxiang¹, CAI Xinxin¹, ZHANG Zheng¹, WANG Chunyuan¹,
LIAO Meijie¹, LI Bin¹, RONG Xiaojun¹, ZHU Hongyang¹, DAI Yan²

(1. Laboratory for Marine Fisheries and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Sciences and Technology, Yellow Sea Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Haiyangyuan Fisheries Development Co., Ltd., Lianyungang 222199, China)

Abstract: Shrimp white feces syndrome (WFS) was highly infectious and causes huge economic losses in shrimp aquaculture industry worldwide. In this study, the relationship between the occurrence of WFS in pond culture *Litopenaeus vannamei* and environmental factors, microbial factors, host immunity and water microbial community composition were analyzed. Measures including water environment factors, culturable bacteria in shrimp hepatopancreas and water, immune activity in shrimp muscle and microbial community structure in water were detected. Compared with the healthy group, the fluctuation trend of water temperature, dissolved oxygen (DO), pH, salinity and other physical and chemical factors in the diseased pond was similar, they were 26.1-29.0 °C, 4.26-6.08 mg/L, 8.39-8.73, 40-49, and DO and salinity were higher than those in the healthy group. The number of culturable bacteria and *Vibrio* spp. in hepatopancreas of the healthy shrimp were 1.19×10^5 - 7.70×10^5 CFU/g and 8.80×10^3 - 1.96×10^4 CFU/g, and the proportion of *Vibrio* spp. was 2%-16%. Furthermore, the number of culturable bacteria and *Vibrio* spp. in hepatopancreas of the diseased shrimp were 3.80×10^5 - 2.51×10^6 CFU/g and 2.02×10^5 - 1.49×10^6 CFU/g, the proportion of *Vibrio* spp. was 55%-70%, the number of *Vibrio* spp. was 15-113 times higher than that of healthy group. The activities of AKP, ACP, LZM, SOD and PO were 1.21-5.64, 9.17-15.25, 3.56-7.43, 4.83-6.70 and 3.10-4.55 U/mg in healthy shrimp muscles, and 2.12-5.39, 19.22-26.96, 19.73-26.85, 3.00-4.14 and 7.76-9.21 U/mg in diseased shrimp muscles. Comparative analysis showed that the occurrence of WFS was correlated with culturable bacteria, the proportion of *Vibrio* spp., ACP, LZM, and PO. Microbial community structure analysis showed that the Ace and Chao indices of water bacteria structure in the diseased group showed a certain degree of downward trend, and the PCoA index was high. The relative abundance of Actinomycetota and Proteobacteria decreased, and the relative abundance of Bacteroidetes and Cyanobacteria increased significantly in diseased group. RDA analysis showed that salinity, DO, culturable bacteria in shrimp hepatopancreas and water and culturable *Vibrio* spp. in shrimp hepatopancreas were the main factors influencing the microbial community structure in the water. The results indicated that the occurrence of WFS is affected by pathogen, body immunity and water microbial community composition, which provides data support for further pathogenic analysis of shrimp WFS, and establishes the theoretical basis for the prevention and control of WFS. The occurrence of aquatic diseases is the result of the comprehensive action of environmental factors, pathogenic microorganisms and host autoimmune ability. Comprehensive analysis of the pathogen of WFS, host immunity and changes in the structure of bacteria in water environment from the production practice is of great significance to explore the related factors of WFS occurrence and comprehensive control. It not only deepens the thinking of studying the occurrence of WFS from multiple perspectives, but also provides valuable information for strengthening the healthy cultivation of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; white feces syndrome (WFS); physical and chemical factors of water; culturable bacteria; immune capacity; microbial community structure

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2019YFD0900102); Taishan Industry Leading Talent (LJNY201802); Policy Guidance Program of Jiangsu Province (SZ-LYG202028)