

胡东,王丽萍,赵苒,等. 福建漳浦凡纳滨对虾海水养殖中后期水体细菌群落多样性分析[J]. 海洋学报, 2017, 39(8): 89—98, doi: 10.3969/j.issn.0253-4193.2017.08.009

Hu Dong, Wang Liping, Zhao Ran, et al. The diversity changes of bacterial community in mariculture water of *Litopenaeus vannamei* at Zhangpu, Fujian Province[J]. Haiyang Xuebao, 2017, 39(8): 89—98, doi: 10.3969/j.issn.0253-4193.2017.08.009

福建漳浦凡纳滨对虾海水养殖中后期 水体细菌群落多样性分析

胡东^{1,2}, 王丽萍², 赵苒¹, 邵宗泽^{2*}

(1. 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102; 2. 国家海洋局第三海洋研究所 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 为分析凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)海水养殖过程中水体细菌群落多样性变化, 本研究采用 Illumina 测序技术对福建漳浦县凡纳滨对虾海水养殖中后期水体样品进行 16S rRNA 基因高通量测序, 同时进行水质参数测定。结果表明, 养殖过程中, 氨氮(NH_4^+-N)、化学需氧量(COD)值波动较大, 其他水质参数值波动较小。检测到的细菌种群归属于 19 个门、35 个纲、80 个目、135 个科、254 个属, 说明该养殖水体中细菌群落具有高度的多样性。变形菌门和拟杆菌门是养殖期间主要优势类群, 不同养殖时期细菌组成存在一定的波动, 但没有明显的变化规律。蓝细菌在第 67 天、115 天表现出高丰度, 且其丰度在养殖期间变化较大(比例变化为 0.7%~63.9%)。此外, 益生菌和潜在致病菌丰度在养殖期间很低。冗余分析(Redundancy analysis, RDA)表明, 对细菌群落影响最大的水质因子是化学需氧量与硝酸盐浓度比值(COD/NO_3^-)和 COD; 降低溶氧可以增加细菌丰富度。总之, 本研究初步揭示了对虾养殖中后期水体微生物的演替规律, 发现水质因子对养殖水体微生物组成具有显著影响, 研究结果为凡纳滨对虾健康养殖提供一定的参考意义。

关键词: 凡纳滨对虾; 微生物群落多样性; 16S rRNA 基因高通量测序; 水质因子

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2017)08-0089-10

1 引言

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)因其具有生长快、抗病能力强、养殖经济效益显著, 成为当今世界上水产养殖产量最高的三大优良对虾品种之一^[1], 其 2011 年产量占全球对虾产量的 76%^[2]。凡纳滨对虾养殖要经历幼虫到成体 5 个生长阶段^[3], 大约 3~4 个月的生长周期才可以上市。养殖动物肠道及养殖

水体中微生物的种类和数量^[4-5], 水质因子^[6](溶氧、温度、pH、化学需氧量、氮等), 饲料投喂, 藻类生长状况等是对虾能否健康成长的关键因素, 了解养殖水体中微生物群落结构、多样性变化及微生物菌群与水体环境因子的相互作用对改善养殖水体、预防对虾疾病发生至关重要。

第二代测序技术为我们研究环境中微生物多样性提供了高效的方法, 结合微生物独有的 16S rRNA

收稿日期: 2017-01-18; 修订日期: 2017-02-22。

基金项目: 厦门南方海洋研究中心项目(14CZP034HJ08); 深远海(极地)微生物及其基因资源开发与产品应用示范(201005032-1); 国家自然科学基金项目(81673129)。

作者简介: 胡东(1990—), 男, 山东省新泰市人, 主要研究方向为海洋环境微生物。E-mail: taianhudong@163.com

* 通信作者: 邵宗泽, 男, 研究员。E-mail: shaozz@163.com

保守基因,这种方法被广泛应用到环境微生物多样性分析^[5, 7-9]。16S rRNA 高通量测序技术已用于淡水环境凡纳滨对虾养殖微生物多样性分析,Zhang 等发现在凡纳滨对虾淡水养殖池中,变形菌门、蓝细菌、放线菌门和拟杆菌门是水体微生物的主要类群;变形菌门、蓝细菌、厚壁菌门、酸杆菌门、绿湾菌门、拟杆菌门是沉积物环境的主要类群^[7]。但鲜有对虾海水养殖环境微生物菌群的相关研究报道,因此,我们的研究可以弥补这方面的空白,丰富人们对凡纳滨对虾养殖环境微生物菌群多样性的认识。

本研究利用 Illumina 高通量测序技术分析了凡纳滨对虾高位池养殖水体细菌多样性的动态变化过程,并分析了菌群与水质参数间的相互关系。研究结果将有助于了解对虾不同养殖时期水体菌群变化规律,认识影响对虾养殖水体菌群变化的环境因子,以期通过调控水质因子,达到改善养殖环境微生物的群落结构的目的,从而促进对虾健康养殖。

2 材料和方法

2.1 样品采集

采样点为福建漳浦县凡纳滨对虾海水养殖场高位池[5 号池,0.9 亩(1 亩=666.67 m²),40 万虾苗]

(24°01′43″ N,117°50′39″E)。采样时间为 2015 年 12 月 24 日至 2016 年 3 月 24 日,即对虾虾苗度过“早期死亡综合症”到对虾收成,实验周期为 3 个月。在离岸 2 m 和虾池中心设置 2 个采样点(S1 和 S2,第 131 天只有 S1 点),使用经过高温湿热灭菌处理的有机玻璃采水器,采集上、中、下 3 层水样共 3 L 于无菌采样瓶中,共采集了 7 个时间点(养殖第 40、59、67、77、95、115、131 天)的 13 个水体样品。采集的水样命名为 P5D&S#,P5 表示 5 号池,D& 表示采样时间编号,S# 表示采样点编号(下同)。水样立即置于放有冰袋的样品箱内保存,并运回实验室用 0.22 μm 滤膜过滤,滤膜于-80℃冰箱中保存。

2.2 水质参数检测

溶氧(DO)、温度(T)、pH 参数通过仪器进行现场检测,即每个采样点分别设置 3 个深度点进行原位参数检测,然后取平均值;亚硝酸盐(NO₂⁻-N)、硝酸盐(NO₃⁻-N)、氨氮(NH₄⁺-N)、化学需氧量(COD)等参数的检测在实验室中进行,检测方法按照《海洋调查规范》GB/T 12763.4-2007 和《海洋检测规范》GB17378.4-2007 进行,每个采样点水样进行 3 次检测取平均值。水质指标及检测方法表 1 所示。

表 1 主要水质指标及检测方法
Tab.1 The main water quality indicators and test methods

测定项目	分析方法
溶氧	哈希便携式溶氧仪(HACH, America)
温度	哈希便携式溶氧仪(HACH, America)
pH	衡欣便携式 pH 计(AZ8601,台湾)
亚硝酸盐	GB/T 12763.4-2007 重氮-偶氮法
硝酸盐	GB/T 12763.4-2007 镉镉还原法
铵盐	GB/T 12763.4-2007 次溴酸钠氧化法
化学需氧量	GB 17378.4-2007 碱性高锰酸钾法

2.3 基因组 DNA 提取

利用 MOBIO 水样基因组提取试剂盒(14900-100-NF,PowerWater® DNA Isolation Kit)进行基因组 DNA 提取。提取的基因组 DNA 质量和浓度分别用 1%琼脂糖凝胶电泳和 nanodrop2000 超微量分光光度计检测,提取的 DNA 在-80℃冰箱中保存。

2.4 16S rRNA 基因高通量测序

提取的基因组 DNA 送上海美吉生物医药科技有限公司,采用引物 338F(5′-3′,ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG)和 806R(5′-3′,GGACTACH-VGGGTWTCTAAT)^[10]对样品进行 PCR 扩增,引物两端带有特异的 barcode 序列,以识别不同样本的 16S rRNA 基因扩增产物;随后采用 Miseq PE300 测

序平台对 PCR 产物测序。

2.5 微生物多样性分析

对原始数据进行拼接、过滤,得到优化序列。然后基于有效数据将相似性达 97% 的序列进行 OTU(Operational Taxonomic Units)聚类。采用 RDP classifier 贝叶斯算法^[11]对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各水平统计每个样品的群落组成。基于 OTU 聚类分析结果,对 OTU 进行多种多样性指数分析,如 Alpha 多样性指数^[12];基于分类学信息,进行群落结构的统计分析^[13];基于系统发育,进行 unifrac 等分析^[14];并结合水质因子进行 RDA 关联分析。在上述分析的基础上,进行一系列群落结构和系统发育等深入的统计学和可视化分析。

3 结果

3.1 养殖池水体的水质参数

为了探讨水质与水体环境微生物菌群多样性的关系,对采集水样进行水质分析(表 2)。在养殖中后期,溶氧基本维持在饱和状态(6.0~8.0 mg/L);温度变化范围为 20~24.6℃,pH 维持在弱碱性(7.2~7.5),变化较小;COD 波动较大,变化范围为 6.9~12.0 mg/L;硝酸盐氮值变化范围为 0.96~1.49 mg/L,亚硝酸盐氮值变化范围为 0.02~0.35 mg/L,氨态氮值变化较大,波动范围为 0.11~4.96 mg/L,其中硝态氮的浓度变化与以往研究明显不同。本研究发现,硝酸盐浓度在养殖过程中总体上呈下降趋势,而以往的报道是养殖后期浓度升高^[15-16]。

表 2 养殖池水质参数的 7 次调查结果
Tab.2 The water quality parameters of seven samplings

	第 40 天	第 59 天	第 67 天	第 77 天	第 95 天	第 115 天	第 131 天	标准偏差值 (STDEV)
溶氧/mg·L ⁻¹	6.0	8.0	6.0	7.3	7.3	7.3	7.5	0.77±0.64
温度/℃	24.6	22.0	21.4	20.0	20.0	23.0	20.0	0.04±0.04
pH 值	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.3	7.2	0.07±0.07
COD/mg·L ⁻¹	9.7	7.4	11.2	9.3	11.5	12.0	6.9	0.58±0.58
硝酸盐氮/mg·L ⁻¹	1.30	1.29	1.49	1.19	1.14	0.96	1.05	0.12±0.11
亚硝酸盐氮/mg·L ⁻¹	0.02	0.20	0.26	0.35	0.35	0.26	0.29	0.01±0.01
氨态氮/mg·L ⁻¹	0.11	0.10	0.29	0.31	1.48	4.96	2.62	0.31±0.30

3.2 Illumina 序列多样性评价

采用 Illumina miseq 测序平台对采集的 7 个时间点 13 个水样进行 16S rRNA 基因高通量测定,13 个样品中共得到 823 363 条序列,序列长度在 281~520 bp 之间,每个样品的序列数目在 55 449~73 485 条之间,抽平后得到 619 775 条高质量序列,每个样品的序列数目为 47 675 条。稀释曲线分析(图 1a)显示,随着测序数量的增加,稀释曲线逐渐趋于平缓,表明该测序量已经基本能够反映该实验中细菌群落多样性。按照 97% 相似度对 OTU 进行划分,其覆盖度均大于 0.99,每个样品得到的 OTU 数目在 294~412 之间。通过 Shannon-Wiener 多样性指数对养殖水体细菌群落多样性进行评估,如图 1b 所示,第 40 天样品微生物多样性最高,而第 67 天样品微生物多样性最

低,其余时间点采集的样品微生物多样性大致相似。

3.3 主成分和聚类分析

主成分分析(Pcoa)结果显示(图 2a),每个时间点采集的两个重复样本都能很好地聚在一起,说明相同时间采集的重复样本细菌群落多样性相似性较高。Unifrac 聚类分析和科水平的细菌群落 Heatmap 分析(图 2b,2c)也是如此。此外,其他水平的细菌群落 Heatmap 分析结果与科水平的细菌群落 Heatmap 分析结果基本一致,相同时间点采集的两个重复样本都能很好的聚在一起,不同时间差异较大。但是,不同时间段之间仍有一定的相似性,第 40、77、95 与 131 天之间的细菌组成相似,而第 67 天与 115 天细菌组成较为相似。

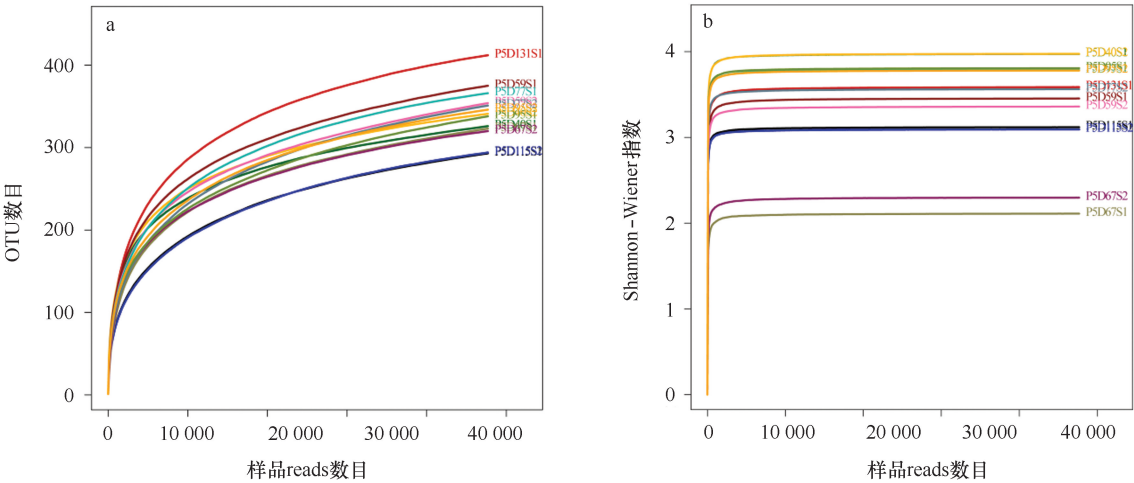


图1 各样品的细菌 16S rRNA 基因的 α 多样性分析

Fig.1 Diversity analysis of 16S rRNA genes in different samples

a.不同样品的稀释曲线;b.不同样品的香农威纳指数图

a.Rarefaction curve of different samples; b.Shannon-Wiener rarefaction curve plot of different samples

3.4 细菌多样性组成

在本研究采集的 7 个时间点 13 个样品中,共检测到 19 个门、35 个纲、80 个目、135 个科、254 个属的细菌。另外,未能鉴定的序列数总共为 5 337 条,这表明样本中存在着大量未知的类群。根据样品中各微生物所测定的 reads 数,把每个样品中 reads 数大于总 reads 数 10% 的门定义为优势门。在不同养殖时期水样检测中,蓝细菌(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿湾菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门(Actinobacteria)、衣原体(Chlamydiae)等 7 个门是主要的优势类群(图 3)。

根据细菌群落组成图可知,养殖水体中的绝大多数序列可以归类于变形菌门和拟杆菌门(图 3),并且这 2 个门在采样期间一直是主要类群。其中,变形菌门在 7 个采样时间点所占的比例分别为 36.2%、13.7%、22.7%、44.6%、38.0%、29.6%、48.8%,主要包括 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和 γ -变形菌纲(Gmmaproteobacteria)(图 4), α -变形菌纲在第 59、115 天样品丰度较低(分别为 8.5% 和 9.3%),而在其他采样时间点丰度普遍较高(丰度变化为 15.1%~38.1%), γ -变形菌纲则在第 59、67 天丰度较低(比例分别为 3.2% 和 6.1%),其他采样时间点丰度普遍偏高(丰度变化为 9.3%~20.1%);拟杆菌门在 7 个采样时间点所占的比例分别为 56.3%、58.8%、10.7%、40.0%、35.4%、19.2%、37.9%,主要包括黄杆菌纲

(Flavobacteriia)和 Sphingobacteriia (图 4),黄杆菌纲在第 67、115 天样品丰度较低(分别为 6.3% 和 4.7%),而在其他采样时间点丰度普遍偏高(丰度变化为 23.1%~52.6%),Sphingobacteriia 在养殖后期丰度较高(各时间点所占比例为 7.0%、5.4%、3.2%、2.6%、6.7%、12.2%、12.4%)。蓝细菌为养殖过程中处于次优势的一个类群,在 7 个采样时间点波动较大,所占的比例分别为 0.7%、3.4%、63.9%、3.6%、16.8%、39.7%、2.5%(图 3)。

整个采样期间,黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、红杆菌科(Rhodobacteraceae)、Cryomorphaceae、Cyanobacteria_norank、腐螺旋菌科(Saprospiraceae)、红菌科(Rhodobiaceae)等优势类群(图 2b),广泛存在于各个养殖时期,并且基本都是优势菌群。拟杆菌门的黄杆菌科在整个采样阶段占优势地位,最高比例可达 48.0%,但第 67、115 天所占比例仅为 2.5%、1.5%。 α -变形菌纲的红杆菌科在整个采样期间也都被检测到,从第 40 天占整个种群的 13.4%降低到第 59、67 天的 3.1%和 5.1%,在第 77 天又成为优势种群(19.2%),随后在第 95、115、131 天分别降低到 9.4%、4.8%和 10.7%;相似的现象在拟杆菌门的 Cryomorphaceae 上被体现,其在整个种群中所占比例由第 40 天的 13.8%减少到第 59、67 天的 3.3%和 3.2%,在第 77 天成为优势种群(13.6%),随后在第 95、115、131 天分别降低到 5.8%、2.7%和 5.3%。属于拟杆菌门的腐螺旋菌科在整个采样期间也是优势类群,其在整个菌

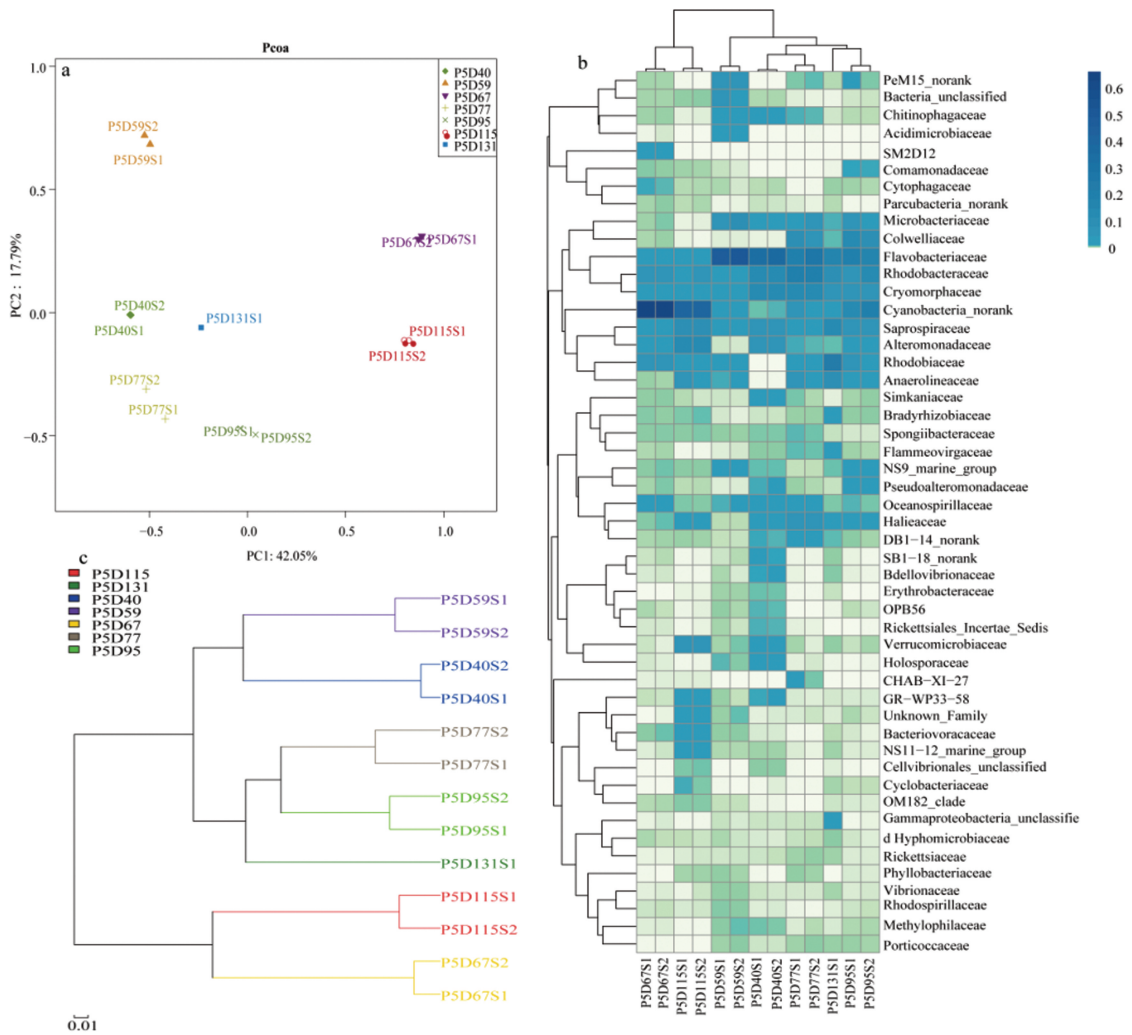


图2 不同样品细菌群落相似性分析

Fig.2 Similarity analysis of microbial populations in different samples

a. 细菌群落的 Pcoa 分析; b. 科水平的细菌群落 heatmap; c. 基于 Unifrac 的聚类分析

a. Pcoa analysis; b. heatmap of bacterial populations at the family level; c. cluster analysis based Unifrac

群中所占比例由第 40 天到第 95 天的低比例(所占比例分别为 5.0%、2.6%、2.7%、1.7%、6.4%)升高到第 115、131 天的 10.4%和 12.0%;相似的现象也在 α -变形菌纲的红菌科上得到体现,其在整个种群中所占比例由采样前期低比例(第 40 天、59 天所占比例分别为 0%和 2.5%)升高到第 131 天的 23.1%。*Cyanobacteria_norank* 表现出与门水平蓝细菌相同的变化,所占比例变化为 0.7%~63.8%。

3.5 细菌群落与水质参数关系

为了分析水质参数对细菌群落的影响,我们先用 species-sample 数据(97%相似性的样本 OTU 表)做 DCA 分析,根据 DCA 分析结果,我们采用 RDA 模型分析养殖水体中细菌群落与环境因子之间的相关

性^[17](图 5a)。RDA 分析结果显示第一轴(RDA1)可以解释 61.8%群落变异性,第二轴(RDA2)可以解释 11.04%。没有发现与第一轴呈明显正相关的环境因子,但是溶氧(DO)与第一轴呈明显的负相关,说明降低溶氧可以增加养殖水体中细菌丰富度;与第二轴呈正相关的是氨氮(NH_4^+)、化学需氧量与硝酸盐浓度比值(COD/NO_3^-)、亚硝酸盐(NO_2^-)和化学需氧量(COD),呈负相关的是 pH 和硝酸盐(NO_3^-)。根据连线箭头长度可知,对水样中总细菌群落影响最大的环境因子是 COD/NO_3^- 、COD,其次是 NO_3^- 和 NH_4^+ ,最后是 pH、DO、亚硝酸盐(NO_2^-)。此外,科水平上的细菌群落与水质参数之间的相关性也以热图形式表现(图 5b)。环杆菌科(Cyclobacteriaceae)、交替单胞

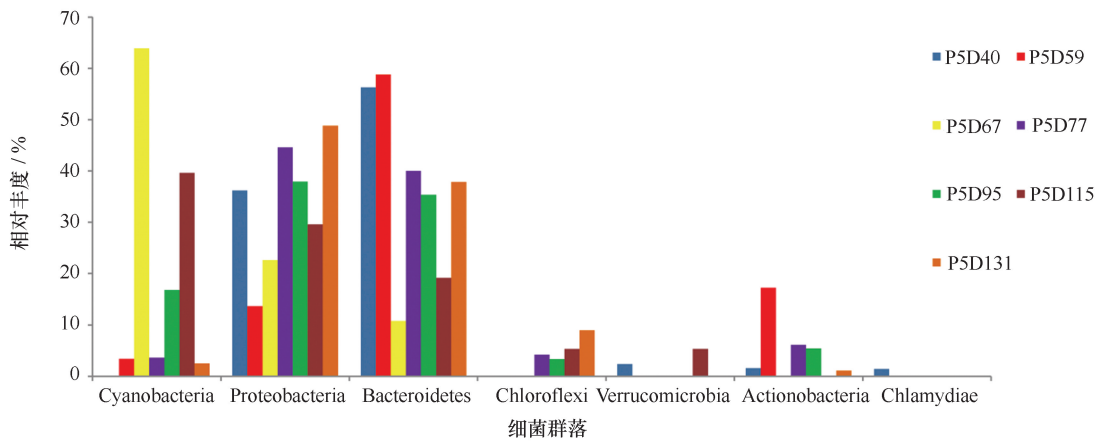


图 3 门水平细菌群落组成

Fig.3 Bacterial community composition at the phylum level

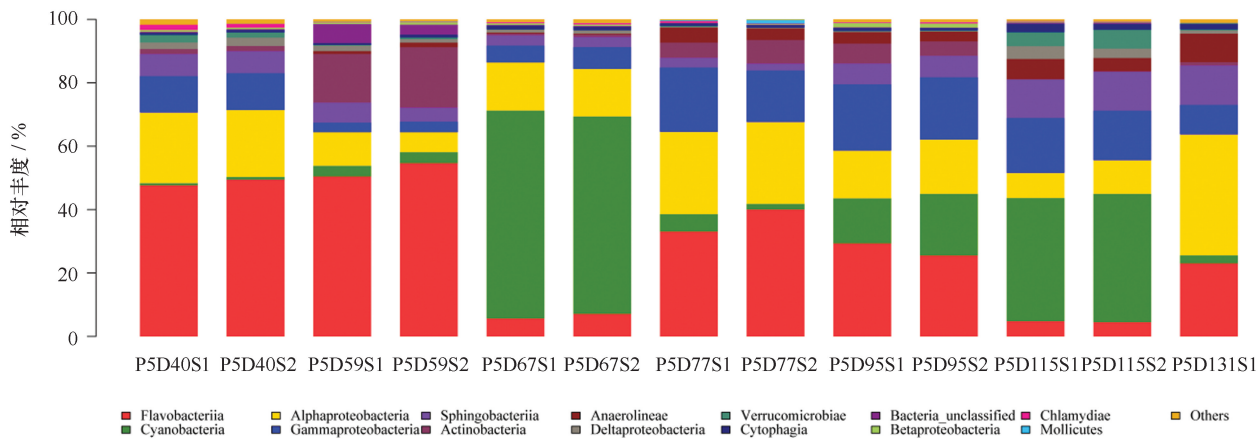


图 4 纲水平上细菌群落变化

Fig.4 Changes of bacterial community in all samples at the class level

菌科(Alteromonadaceae)、疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)、腐螺旋菌科(Saprospiraceae)、噬菌科(Bacteriovoraceae)等 9 个科与 COD/NO_3^- 有明显正相关($P<0.05$);全孢菌科(Holosporaceae)、赤杆菌科(Erythrobacteraceae)、蛭弧菌科(Bdellovibrionaceae)、全孢菌科等 8 个科与 NO_2^- 有明显负相关($P<0.05$),它们则与温度、pH 之间呈现明显的正相关;交替单胞菌科、疣微菌科、腐螺旋菌科、环杆菌科、噬菌科等 12 个科与 NH_4^+ 呈明显的正相关($P<0.05$)。

4 讨论

本研究通过 Illumina 高通量测序技术初步揭示了凡纳滨对虾养殖中后期养殖水体中细菌群落多样性变化及其与水质之间的相互关系。Pcoa 分析和聚类分析表明,养殖中期第 40 天和第 59 天细菌群落组

成相似,第 77、95 天与养殖后期第 131 天细菌群落组成更相似,而第 67 天和第 115 天样品与其他时间点的样品差异较大。此外,同一个时间点采集的两个样品重复性较好,说明数据较为可靠。从 7 个时间点采集的 13 个水体样品中共获得 619 775 条高质量序列,检测到的细菌群落归属于 19 个门、35 个纲、80 个目、135 个科、254 个属,说明该养殖水体中细菌群落具有很高的多样性。注释结果表明,这些序列主要属于变形菌门、拟杆菌门和蓝细菌等 3 个门类。此外,未能鉴定的序列数总共为 5 337 条,占总序列数比例为 0.86%,说明凡纳滨对虾养殖环境中还存在着大量未描述过的类群。

在本研究中,变形菌门、拟杆菌门广泛存在于凡纳滨对虾各个养殖时期的水体中,并且为优势类群。相似的结果在前人的研究中也发现,在凡纳滨对虾淡

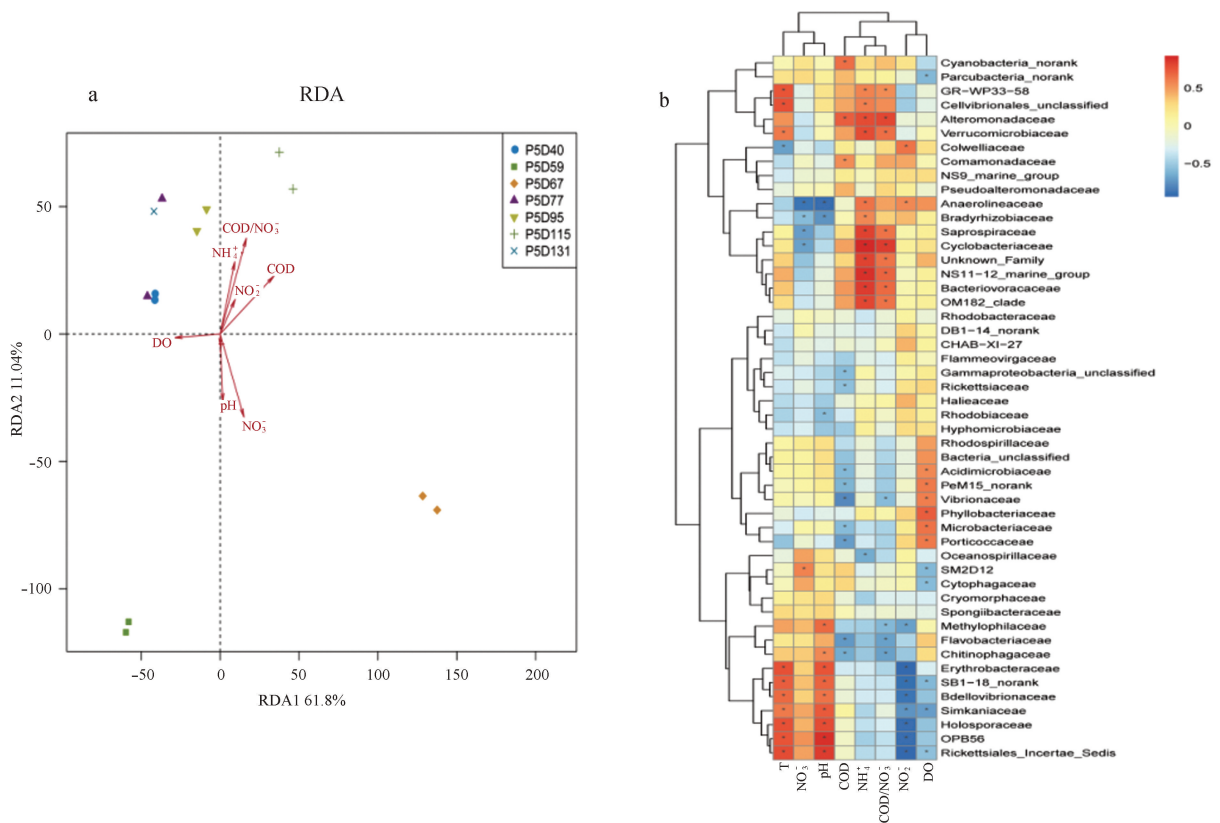


图5 水质参数与细菌群落之间的关系

Fig.5 The correlation between water quality parameters and bacterial community composition

a.细菌群落组成与水质的 RDA 分析; b.科水平上细菌群落与水质相关性热图

a. Redundancy analysis (RDA) of the bacterial community composition with water quality parameters (red arrows); b. heatmap showing the correlation between bacterial community and the water quality parameters at the family level

水养殖系统中,养殖水体温度高时,放线菌门、unclassified bacteria、变形菌门和拟杆菌门是主要的类群;养殖水体温度低时,主要的优势类群是放线菌门、变形菌门和拟杆菌门^[18]。同样,Zhang 等发现在凡纳滨对虾淡水养殖池中,变形菌门、蓝细菌、放线菌门和拟杆菌门是水体微生物的主要类群^[7]。Huang 等研究发现,不同生长时期凡纳滨对虾肠道的优势类群是变形菌门、拟杆菌门和放线菌门^[5]。由此可见,变形菌门和拟杆菌门是凡纳滨对虾肠道和水体环境常见的优势类群。此外,在本研究中蓝细菌在第 67、115 天样品中占绝对优势,文献报道光照强并且营养盐丰富,有利于蓝细菌繁殖^[19],但是实验记录同时期为阴雨天气,说明其他环境参数影响着蓝细菌丰度变化。

尽管不同养殖时期水体微生物在门水平上组成较相似,但在纲水平和科水平上,细菌类群构成变化较大。在纲水平上,黄杆菌纲、 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲为第 40 天样品的优势类群,第 59 天样品的主要类群为黄杆菌纲和放线菌纲(Actinobacteria),而第 67

天样品的优势类群波动较大,转变为 Cyanobacteria_norank 和 α -变形菌纲。第 77、95、131 天样品菌群以黄杆菌纲、 α -变形菌纲、和 γ -变形菌纲为主,而第 115 天样品的优势类群为蓝细菌、 γ -变形菌纲和 *Sphingobacteriia*。可以看出 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲和黄杆菌纲是纲水平上的主要优势类群。变形细菌是所有细菌中最大和最具有多样性的一个族群,具有较强的适应性,它们在水体中分布广泛^[20],其中 α -和 γ -变形菌纲在海水浮游细菌中尤为重要。已有的关于黄杆菌的研究表明,黄杆菌可以改善底质环境状况,在维持菌落方面起重要作用,其多为有益菌^[20],这可能是该虾池健康养殖的主要原因。在科水平上,黄杆菌科、红杆菌科、Cryomorphaceae、Cyanobacteria_norank、腐螺旋菌科、红菌科等类群,广泛存在于养殖水体中,并且为各个养殖时期的优势或者次优势菌。科水平上,黄杆菌科、红杆菌科和 Cryomorphaceae 为第 40 天样品的优势菌类群,黄杆菌科和微杆菌科(Microbacteriaceae)为第 59 天样品的优势类群,蓝细菌为第 67

天样品的优势菌,黄杆菌科、红杆菌科和 Cryomorphaceae 为第 77 天样品的优势类群,黄杆菌科、蓝细菌和科韦氏氏科(Colwelliaceae)为第 95 天样品的优势类群,蓝细菌、腐螺旋菌科和交替单胞菌科(Alteromonadaceae)为第 115 天样品的优势菌类群,交替单胞菌科、红杆菌科、腐螺旋菌科和红杆菌科为第 131 天样品的优势类群。黄杆菌科在整个采样期间是占优势的微生物类群,研究报道表明黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)在鳟鱼(Trout)养殖中是一类严重的病原菌,可以导致虹鳟鱼鱼苗综合症(RTFS)和冷水病(CWT)^[21]; *Tamlana* 作为一种潜在的益生菌可以产生琼脂酶^[22]; *Tenacibaculum maritimum* 可以导致鱼类产生 gliding bacterial disease 和 tenacibaculosis/flexibacteriosis 等疾病^[23]。同样红细菌科在整个采样期间是占优势的微生物类群,研究表明玫瑰杆菌(*Roseobacter*)能在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔鱼的饲养环境中建立一个有益的微生物群落,可以抑制致病菌的生存^[24],降低大菱鲆幼鱼的死亡率^[25]。值得注意的是,上述这些主要的优势类群在养殖的第 59、67、115 天表现出相对较低的丰度,如纲水平上 α -变形菌纲在第 59、115 天丰度较低, γ -变形菌纲在 59、67 天丰度较低,黄杆菌纲在 67、115 天丰度较低;科水平上黄杆菌科在第 67、115 天丰度较低,红杆菌科、Cryomorphaceae 在第 57、67、115 天丰度较低。

在整个采样期间还检测到黄杆菌属(*Flavobacterium*),希瓦氏菌属(*Shewanella*),弧菌属(*Vibrio*),假单胞菌属(*Pseudomonas*)和 *Escherichia-Shigella* 等水生动物潜在的条件致病菌^[7, 24, 26—27],除黄杆菌属和弧菌属外,其他菌属在所有样品中都维持低丰度(小于 0.1%)。其中弧菌为对虾常见的致病菌,已知副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、坎贝氏弧菌(*V. campbellii*)都是凡纳滨对虾主要的致病菌^[28],本研究中发现的弧菌主要为坎贝氏弧菌。潜在致病菌低 reads 数表明在进水温度适宜的情况下,增加换水频数不失为一种预防对虾病害发生的有效方法。此外,本研究在对各个时期养殖水体微生物的多样性分析中,同样检测到一定丰度的潜在益生菌,主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[29]、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)^[24]、拟杆菌属(*Bacteroides*)^[7]、乳球菌属(*Lactococcus*)^[24],尽管它们的丰度低,但这些益生菌会降低潜在致病菌等危害因素导致对虾发病几率增加的可能性。

水质是凡纳滨对虾是否可以健康成长的重要环

境因素之一,之前的研究表明温度^[18]和营养盐类^[7, 30—31]对水体微生物组成有重要的影响。同样,本文的实验结果也表明水质参数对水体菌群有一定影响。RDA 分析表明凡纳滨对虾养殖水体中对总细菌群落影响最大的水质因子是化学需氧量与硝酸盐浓度比值(COD/NO₃⁻)、COD,其次是 NO₃⁻和 NH₄⁺。值得关注的是, NH₄⁺ 浓度波动范围较大,但是对菌群变化影响却很小。我们未发表的结果显示该养殖水体中存在高丰度反硝化功能基因和异化硝酸盐还原到铵过程(DNRA)的功能基因,此外,16S rRNA 基因高通量测序数据和氮循环功能基因克隆文库也有相对应关系,说明该水体中存在着特定的氮循环机制维持着氮素平衡,使对虾免受伤害。此外,科水平上细菌群落与水质相关性热图分析进一步说明,水质因子对不同的细菌群落有不同的影响。COD/NO₃⁻和 NH₄⁺ 两个水质因子参数对科水平上细菌群落影响比较相似,而 NO₃⁻和 pH 两个水质因子参数对科水平上细菌群落影响比较相似。环杆菌科、交替单胞菌科、疣微菌科、腐螺旋菌科、噬菌科等 9 个科与 COD/NO₃⁻ 有明显正相关($P < 0.05$);交替单胞菌科、疣微菌科、腐螺旋菌科、环杆菌科、噬菌科等 12 个科与 NH₄⁺ 呈明显的正相关($P < 0.05$);全孢菌科、赤杆菌科、蛭弧菌科、全孢菌科等 8 个科与 NO₂⁻ 有明显负相关($P < 0.05$),它们则与温度、pH 之间呈现明显的正相关。

5 结论

本研究通过 Illumina 16S rRNA 高通量测序方法分析了凡纳滨对虾高位池养殖水体中后期微生物群落多样性及变化规律以及微生物菌群与水质参数间的相互关系。分析结果表明,凡纳滨对虾养殖水体中微生物群落结构具有高度的多样性,不同养殖时期水体微生物组成存在一定的波动,变形菌门、拟杆菌门、蓝细菌等 3 个门类是主要的优势类群;纲水平上,黄杆菌纲、 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲等类群是优势类群;科水平上黄杆菌科、红杆菌科、Cryomorphaceae、Cyanobacteria_norank、腐螺旋菌科、红杆菌科等类群,广泛存在于养殖水体中,并且为各个养殖时期的优势或者次优势菌。这些主要的优势类群在第 59、67、115 天表现出相对较低的丰度,但蓝细菌表现出相对较高的丰度。化学需氧量与硝酸盐浓度比值(COD/NO₃⁻)和 COD 是对细菌群落影响最大的水质因子。本研究养殖水体中的凡纳滨对虾呈现健康的生长状态,因此

本研究中微生物菌群多样性动态变化结果可以作为一种健康养殖模式下微生物菌群多样性的映射,可通过调控水质因子来预防海水养殖凡纳滨对虾病害发生。

致谢:感谢国家海洋局第三海洋研究所海化实验室林彩老师对水质参数 COD 测定提供的帮助;感谢国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室杨洋、杨硕、黄兆斌、刘阳对水样采集提供的帮助。感谢厦门大学公共卫生学院郭东北老师提供的水样采集仪器。

参考文献:

- [1] Tu C, Huang H T, Chuang S H, et al. Taura syndrome in pacific white shrimp *penaeus vannamei* cultured in Taiwan[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 38(2): 159—161.
- [2] Yu Yang, Wei Jiankai, Zhang Xiaojun, et al. SNP discovery in the transcriptome of white Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* by next generation sequencing[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87218.
- [3] Zheng Yanfen, Yu Min, Liu Yan, et al. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages[J]. Aquaculture, 2016, 451: 163—169.
- [4] Boutin S, Bernatchez L, Audet C, et al. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84772.
- [5] Huang Zhaobin, Li Xiaoyi, Wang Liping, et al. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Research, 2014, 47(6): 1737—1746.
- [6] Berdjeb L, Ghiglione J F, Jacquet S. Bottom-up versus top-down control of hypo-and epilimnion free-living bacterial community structures in two neighboring freshwater lakes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3591—3599.
- [7] Zhang Hao, Sun Zhenli, Liu Bo, et al. Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors[J]. Aquaculture, 2016, 455: 97—108.
- [8] Rosselli R, Romoli O, Vitolo N, et al. Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32165.
- [9] Yan Qingyun, Bi Yonghong, Deng Ye, et al. Impacts of the three gorges dam on microbial structure and potential function[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8605.
- [10] Xu Nan, Tan Guangcai, Wang Hongyuan, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. European Journal of Soil Biology, 2016, 74: 1—8.
- [11] Wang Qiong, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261—5267.
- [12] Schloss P D, Gevers D, Westcott S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e27310.
- [13] Oberauer L, Zachow C, Lackner S, et al. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1413.
- [14] Rivas N M, Burton O T, Wise P, et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013, 131(1): 201—212.
- [15] 李卓佳, 李奕雯, 曹煜成, 等. 凡纳滨对虾海水高位池养殖水体理化因子变化与营养状况分析[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10): 2025—2032.
- [16] Li Zhuojia, Li Yiwen, Cao Yucheng, et al. Analysis of physical-chemical factors variation and nutritional status of *litopenaeus vannamei* high level seawater ponds[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(10): 2025—2032.
- [17] 张瑜斌, 章洁香, 詹晓燕, 等. 高位虾池养殖过程主要理化因子的变化及水质评价[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 628—634.
- [18] Zhang Yubin, Zhang Jiexiang, Zhan Xiaoyan, et al. Changes in main physicochemical factors in water and assessment of water quality during culture in higher-level shrimp ponds[J]. Fisheries Science, 2009, 28(11): 628—634.
- [19] Sheik C S, Mitchell T W, Rizvi F Z, et al. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e40059.
- [20] Tang Yuyi, Tao Peiying, Tan Jianguo, et al. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 13663—13680.
- [21] 李爽, 姜华, 张德民, 等. 光合细菌及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产, 2007(1): 81—82.
- [22] Li Shuang, Jiang Hua, Zhang Demin, et al. Photosynthetic bacteria and its application in aquaculture[J]. China Fisheries, 2007(1): 81—82.
- [23] 王姣姣, 李丹, 宋坚, 等. 不同时期刺参养殖池塘海水菌群结构分析[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(2): 134—140.
- [24] Wang Jiaojiao, Li Dan, Song Jian, et al. Structural analysis of seawater bacterial community from culture pond of *apostichopus japonicus* at different periods[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(2): 134—140.
- [25] Stenholm A R, Dalsgaard I, Middelboe M. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *flavobacterium*

- psychrophilum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4070–4078.
- [22] 姜海峰, 刘小林, 常亚青, 等. 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)肠道潜在益生菌的筛选及对幼鲍生长的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 482–487.
- Jiang Haifeng, Liu Xiaolin, Chang Yaqing, et al. Selection of potential probiotics from abalone intestinal and their effects on growth of juvenile small abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 482–487.
- [23] Romero M, Avendano-Herrera R, Magariños B, et al. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 304(2): 131–139.
- [24] Ninawe A S, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009, 35(1): 43–66.
- [25] Bruhn J B, Nielsen K F, Hjelm M, et al. Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter clade*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7263–7270.
- [26] Duchaud E, Boussaha M, Loux V, et al. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(7): 763–769.
- [27] Khashe S, Janda J M. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(3): 783–787.
- [28] Wang Liping, Chen Yanwu, Huang Hui, et al. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 395–404.
- [29] Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T, et al. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3/4): 443–450.
- [30] Tas S, Yilmaz I N, Okus E. Phytoplankton as an indicator of improving water quality in the golden horn estuary[J]. Estuaries and Coasts, 2009, 32(6): 1205–1224.
- [31] Tian Chuan, Tan Jing, Wu Xin, et al. Spatiotemporal transition of bacterioplankton diversity in a large shallow hypertrophic freshwater lake, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Journal of Plankton Research, 2009, 31(8): 885–897.

The diversity changes of bacterial community in mariculture water of *Litopenaeus vannamei* at Zhangpu, Fujian Province

Hu Dong^{1,2}, Wang Liping², Zhao Ran¹, Shao Zongze²

(1.School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanograph, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: To explore the diversity changes of bacterial communities in mariculture water, water samples from *Litopenaeus vannamei* culture ponds in the middle and late growth stages at the farms located at Zhangpu, Fujian Province, China, were collected. Bacterial communities were analyzed through Illumina Miseq sequencing based on 16S rRNA gene, and the water quality parameters were also detected. The results showed that the water quality factors, such as $\text{NH}_4^+\text{-N}$, COD, fluctuated greatly compared with other parameters. 19 phyla, 35 classes, 80 orders, 135 families and 254 bacterial genera were detected, which indicated a high diversity of microbial flora. *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* are the main dominant group during culture, and while there was a certain fluctuation of microbial composition in different aquaculture periods, no obvious change law was observed. *Cyanobacteria* showed high abundance at the day of 67 and 115, and their abundance varied greatly during culture (0.7% to 63.9%). In addition, the abundance of probiotics and potential pathogens is low during culture. The RDA results showed that COD/ NO_3^- and COD contents in water had the greatest influence on bacterial communities, and reduced DO can increase bacterial richness. This study revealed the change of bacterial community in the middle and late stages of *L. vannamei* culture, and found that water quality factors had a significant effect on microbial composition. The results provided a significant reference for the healthy aquaculture of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microbial community; 16S rRNA gene high throughput sequencing; water quality parameters