



## 研究报告

## 基于 16S rRNA 基因扩增子测序分析日本囊对虾肠道菌群结构与功能的特征

曾晨熾<sup>1</sup> 林茂<sup>\*1,2</sup> 李忠琴<sup>1</sup> 马英<sup>1</sup> 王淑红<sup>1</sup><sup>1</sup> 集美大学水产学院 厦门市渔用药物工程技术研究中心 福建 厦门 361021<sup>2</sup> 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021

**摘要:** 【背景】肠道菌群在对虾的生理活动中起关键作用。日本囊对虾是我国海水养殖虾类中的主要品种之一,迄今为止有关其肠道菌群结构与功能的研究还鲜有报道。【目的】利用高通量测序技术探究日本囊对虾肠道菌群的组成结构与功能作用,揭示虾体肠道菌群与外源菌群结构间的相关性。【方法】60 d 的养殖周期结束后,分别采集日本囊对虾肠道样品(归为虾肠组, n=3)、养殖水体样品(归为水体组, n=3)和对虾饲料样品(归为饲料组, n=3),提取各样品总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增子测序,基于生物信息学方法分析与比较样品间的菌群结构特征,并使用 PICRUSt 软件预测日本囊对虾肠道菌群功能。【结果】3 组样品测序共获得 822 713 条有效序列,抽平处理后可聚类为 3 416 个 OTU。虾肠组样品中有 28.49%、59.30% 的 OTU 可以依次在水体组、饲料组样品中检测到。门水平上,虾肠组样品中的优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和梭杆菌门(*Fusobacteria*)。水体组、饲料组与虾肠组样品中的优势菌门结构不尽相同,但均由变形菌门和拟杆菌门组成。属水平上,虾肠组样品中的优势菌属包括弧菌属(*Vibrio*)、另类弧菌属(*Aliivibrio*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、假黄棕杆菌属(*Pseudofulvibacter*)、科尔韦尔氏菌属(*Colwellia*)、小纺锤状菌属(*Fusibacter*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)以及弓形杆菌属(*Arcobacter*)。水体组和饲料组中检出的核心菌属结构与虾肠组相比有明显差异,其中海命菌属(*Marivita*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)分别为养殖水体及对虾饲料样品中的最优势菌属。PICRUSt 预测结果显示,日本囊对虾肠道菌群的基因功能主要与新陈代谢类功能有关,包含氨基酸代谢、碳水化合物代谢与能量代谢等。【结论】日本囊对虾肠道菌群与其他种类对虾肠道菌群的结构间存在共性,其形成在一定程度上受到了外源菌群的干预,并在虾体的日常代谢活动中发挥了一定的作用。

**关键词:** 日本囊对虾, 16S rRNA 基因扩增子测序, 肠道菌群, 功能预测

**Foundation items:** Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203085); Xiamen Special Fund for Marine and Fishery Development (18CZP001HJ06); Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01695)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-592-6180204; E-mail: linmao@jmu.edu.cn

**Received:** 15-09-2019; **Accepted:** 22-11-2019; **Published online:** 12-12-2019

**基金项目:** 公益性行业科研专项(201203085); 厦门市海洋与渔业发展专项资金(18CZP001HJ06); 福建省自然科学基金(2019J01695)

**\*通信作者:** Tel: 0592-6180204; E-mail: linmao@jmu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-09-15; **接受日期:** 2019-11-22; **网络首发日期:** 2019-12-12

## The structural and functional characteristics of the gut microbiota of *Marsupenaeus japonicus* as revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing

ZENG Chen-Xi<sup>1</sup> LIN Mao<sup>\*1,2</sup> LI Zhong-Qin<sup>1</sup> MA Ying<sup>1</sup> WANG Shu-Hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fisheries College, Jimei University, Engineering-Technology Research Center for Fishery Medicine, Xiamen, Fujian 361021, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen, Fujian 361021, China

**Abstract: [Background]** Gut microbiota plays a pivotal role in the physiological activities of prawns. The Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) is one of the most important seawater prawn species for aquaculture in China. However, until now, little is known about the structure and function of gut microbiota in *M. japonicus*. **[Objective]** To explore the bacterial structure and function in the intestines of *M. japonicus* and to investigate the impact of external (water and feed) microbes on the structure of *M. japonicus* gut microbiota by using high-throughput sequencing technology. **[Methods]** After 60 days of culture period, the *M. japonicus* intestines (n=3), pond water (n=3), and prawn feed (n=3) samples were collected respectively, and then total genome DNA was extracted from each sample for 16S rRNA gene amplicon sequencing. The comparative analysis of bacterial composition of all samples was based on bioinformatics methods, and PICRUSt software was performed to predict the functional profiles of *M. japonicus* gut microbiota. **[Results]** A total of 822 713 valid reads were obtained from the sequencing data, resulting in 3 416 OTUs after data rarefying, and there were 28.49%, 59.30% of OTUs observed in prawn gut samples could also be found in water and diet samples, respectively. The predominant phyla observed in prawn gut samples were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Fusobacteria*, which were different from those present in water and diet samples, except for *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. The major genera identified in prawn gut samples were *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudofulvibacter*, *Colwellia*, *Fusibacter*, *Photobacterium*, *Desulfovibrio*, *Psychrobacter*, and *Arcobacter*. Moreover, culture-associated environmental microbes were distinct from those present in prawn intestines, and included *Marivita* (the most abundant genus in water samples) and *Pseudomonas* (the most abundant genus in diet samples). PICRUSt analysis revealed that the core functional profile of gut bacterial community in *M. japonicus* was metabolism, including amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, energy metabolism, and etc. **[Conclusion]** There existed some similarities in gut microbiota structure between *M. japonicus* and other prawn species. The structure of *M. japonicus* gut microbiota, which played a certain role in daily metabolic activities of the host, was partly influenced by the external microbes.

**Keywords:** *Marsupenaeus japonicus*, 16S rRNA gene amplicon sequencing, Gut microbiota, Functional prediction

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)又称日本对虾(Kuruma prawn),因其肉质鲜美且具有耐低温、耐干能力强、经济价值高等优点,从而受到消费者和养殖业者的青睐。作为我国海水养殖虾类中的主要品种之一,日本囊对虾在国内的南北方沿海地区均有多年的养殖历史并形成了较大的养殖规模<sup>[1-2]</sup>。据统计,2018年全国日本囊对虾的海水养

殖产量为 55 228 t (较 2017 年同期增长了 5.26%),占海水养殖虾类总产量的 3.92%<sup>[3]</sup>。

肠道是机体关键的消化吸收场所,其中定居着大量的微生物群落(如细菌、真菌、病毒等),正常情况下其在宿主体内相互依赖、相互制约并维持着内环境稳态。肠道菌群对宿主的生理活动有很大影响,其组成与遗传、营养和环境等多种因素

有关,更被视为机体不可分割的“隐形器官”<sup>[4-6]</sup>。肠道细菌类群是该“隐形器官”中的重要部分,在虾类的生长发育、消化吸收以及免疫防病等方面发挥着举足轻重的作用<sup>[7]</sup>。

研究表明,外源微生物能够影响虾类肠道菌群的构成,因而探究二者结构间的相关性将为对虾的健康养殖提供新的思路<sup>[8-9]</sup>。目前,国内外有关虾类肠道菌群的研究主要集中在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[10-12]</sup>,而对日本囊对虾肠道菌群的研究报道仍鲜见。本文旨在利用高通量测序技术,探讨日本囊对虾肠道细菌的群落结构与功能作用,分析虾体肠道与养殖水体、饲料中菌群结构间的关联,以期丰富和拓展日本囊对虾肠道微生物的基础研究,并为促进对虾养殖业的健康发展及虾类潜在益生菌的开发提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

PowerFecal<sup>®</sup> DNA 提取试剂盒, QIAGEN 公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, Axygen 公司。多参数水质测定仪、PCR 仪、凝胶成像系统, Thermo Fisher Scientific 公司; 电泳仪, 上海天能科技有限公司; QuantiFluor<sup>™</sup>-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司; MiSeq 测序仪, Illumina 公司。

### 1.2 养殖实验及样品采集

实验地点位于福建省漳州市漳浦县沙西镇对虾养殖基地。健康、规格整齐的日本囊对虾购自龙海市江腾水产发展有限公司, 体长约  $2.1 \pm 0.4$  cm, 体重约  $1.9 \pm 0.4$  g, 暂养 7 d 后随机放入 3 个室内水泥池(每池面积为  $16 \text{ m}^2$ , 配备有增氧、控温、铺沙、排污装置, 水深 1 m), 养殖密度为  $300 \text{ 尾}/\text{m}^2$ 。实验水源为海水, 养殖期间连续充氧, 每日换水量 50%。本研究选用普通商品饲料, 养殖过程中于每日 6:00、11:00、16:00、21:00 记录水质变化情况并饱食投喂对虾, 投饵量以吃食情况适当调整。实

验期间水体盐度稳定在 2.3% 左右、水温为  $25\text{--}27^\circ\text{C}$ 、pH 值为 8.3–8.6、溶解氧为 5.7–7.9 mg/L、总氨氮  $<0.02 \text{ mg/L}$ 。

为期 60 d 的养殖实验结束后, 共采集 3 组(每组 3 个)样品, 分别为虾肠组(JG)、水体组(JW)、饲料组(JD)。虾肠组(JG): 将日本囊对虾停食 24 h 后, 在 3 个养殖池中随机取大小长度相近的健康对虾, 于无菌环境下剖取肠道, 把同个养殖池中 5 尾对虾(四角和中间位置各取 1 尾)的肠道混合作为 1 个样品, 每池收集 1 个肠道样品。3 个肠道样品分别置于不同的无菌离心管中,  $-80^\circ\text{C}$  保存。水体组(JW): 利用有机玻璃采水器在 3 个养殖池中取水样, 每池采集 1 个水样(包含上、中、下三层水体共 500 mL)。3 个水样分别通过  $5 \mu\text{m}$  孔径的混合纤维膜去除杂质后, 再经  $0.2 \mu\text{m}$  无菌聚醚砜膜过滤并收集滤膜于不同的无菌离心管中备用。饲料组(JD): 采集 3 份对虾饲料样品。

### 1.3 样品基因组 DNA 的提取、PCR 扩增与高通量测序

采用 PowerFecal<sup>®</sup> DNA 提取试剂盒分别抽提日本囊对虾肠道、养殖水体和饲料样品总 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量后, 以通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增各样品总 DNA 上 16S rRNA 基因的 V3–V4 区序列。PCR 反应的体系及条件参照文献<sup>[13]</sup>。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒将目标片段切胶回收。利用 QuantiFluor<sup>™</sup>-ST 蓝色荧光定量系统对 PCR 产物进行检测定量, 并根据结果将各样品等量混合, 而后构建 MiSeq 文库进行高通量测序。

### 1.4 测序数据分析

基于 MiSeq PE300 平台测序, 利用 USEARCH 软件<sup>[14]</sup>对原始数据进行质控, 按照 97% 相似性对

非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(optional taxonomic unit, OTU)聚类,选取每个 OTU 中相对丰度最高的序列为代表序列。采用 RDP classifier<sup>[15]</sup>贝叶斯算法对获得的 OTU 代表序列作分类学分析(置信度阈值为 0.8),并选用 SILVA 数据库进行物种比对注释。为消除因测序深度不同所引起样本间的多样性评估偏差,将各样品测得的有效数据抽平(data rarefying)处理后再进行后续分析。基于 OTU 数据计算各样品中菌群的  $\alpha$  多样性指数与相对丰度,并采用加权(weighted) UniFrac 距离算法结合主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)与层级聚类分析比较各样品中菌群结构的差异。根据测序结果,利用 PICRUST 软件<sup>[16]</sup>预测日本囊对虾肠道菌群功能。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据统计与分析

3 组(9 个)样品测序共获得 822 713 条有效序列,组间平均测序覆盖率为 99.56%–99.77%,这表明本次实验所测得的数据能够真实反映样品中绝大多数细菌类群的组成情况(表 1)。将各样品测得的有效序列按最小样品序列数进行抽平处理后,可聚类为 3 416 个 OTU。

JG 组、JW 组、JD 组样品中检出的 OTU 数依次为 1 253、726、2 593 个, JG 组与 JW 组共有的 OTU 数为 357 个, JG 组与 JD 组共有的 OTU 数为 743 个, 3 组共有的 OTU 数为 135 个(图 1)。上述

结果表明,各组样品所检测到的细菌类群在 OTU 水平上存在一定关联。此外,  $\alpha$  多样性分析结果显示, JD 组样品中菌群的丰富度(以 Chao1 指数和 ACE 指数来衡量)总体上依次高于 JG 组和 JW 组样品,而 JD 组样品中菌群的多样性(以 Shannon 指数与 Simpson 指数来衡量)总体上依次高于 JW 组和 JG 组样品(表 1)。

### 2.2 $\beta$ 多样性分析

在 OTU 水平上,基于加权 UniFrac 距离对所有样品进行三维主坐标分析后发现, JG 组、JW 组与 JD 组样品中菌群结构的组间差异明显(不同组样品在其投影平面上的间距较远,大都分散于不同象限),而组内差异较小(同组样品在其投影平面上的间距较近,大都聚集在一起)(图 2)。

### 2.3 细菌群落的组成与结构

在门水平上: JG 组中的优势菌门(平均相对丰度>1%)是变形菌门(*Proteobacteria*, 78.69%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 11.30%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 4.88%)与梭杆菌门(*Fusobacteria*, 2.37%); JW 组中的优势菌门为蓝细菌门(*Cyanobacteria*, 33.87%)、变形菌门(29.74%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 19.01%)、拟杆菌门(13.49%)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*, 2.24%); JD 组中的优势菌门为变形菌门(45.14%)、蓝细菌门(19.13%)、厚壁菌门(10.09%)、绿湾菌门(*Chloroflexi*, 5.99%)、拟杆菌门(5.63%)、酸杆菌门(*Acidobacteria*, 4.72%)、放线菌门(3.16%)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*, 1.61%)及浮霉菌门(*Planctomycetes*, 1.46%)(图 3)。

表 1 各样品组中检测到的有效序列数、抽平后的 OTU 数及  $\alpha$  多样性指数

Table 1 The number of valid reads, rarefying OTUs and alpha diversity indices observed in different sample groups

Group	Valid reads	OTUs	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index	Coverage (%)
JG	115 892±14 739	601±414	809.91±493.99	855.21±501.98	3.31±0.36	0.08±0.02	99.56±0.29
JW	70 191±22 277	468±64	568.45±81.82	563.99±89.09	3.81±0.35	0.05±0.02	99.77±0.04
JD	62 403±26 833	1 273±443	1 339.55±452.77	1 314.04±438.42	4.51±1.31	0.03±0.02	99.77±0.02

注:表中数据为平均值±标准差; JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组。

Note: Data in the table are the  $\bar{X} \pm SD$ ; JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group.

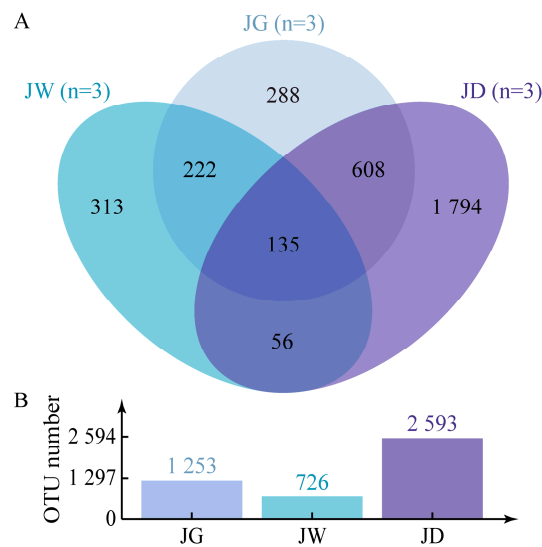


图 1 各样品组中检测到 OTU 数量的韦恩图(A)与柱形图(B)比较

Figure 1 Venn diagram (A) and bar chart (B) of OTUs number observed from different sample groups

注: JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组.

Note: JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group.

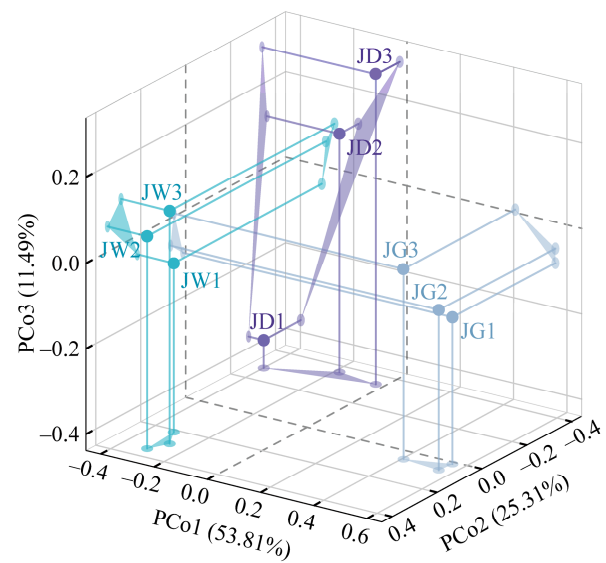


图 2 各样品基于加权 UniFrac 距离的三维主坐标分析

Figure 2 3D principal coordinates analysis of each sample based on weighted UniFrac distance

注: JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组.

Note: JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group.

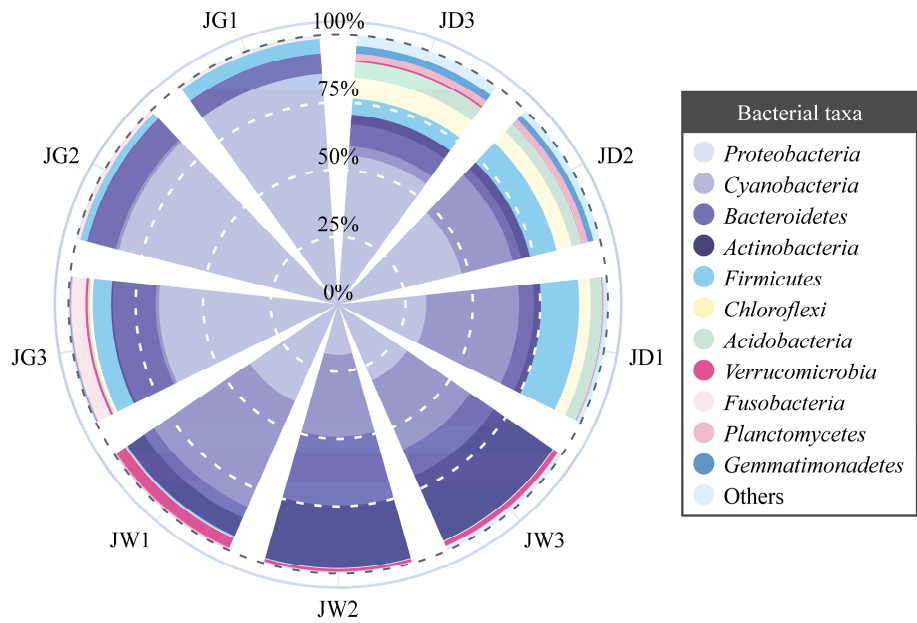


图 3 门水平上各样品中细菌类群的相对丰度和组成结构

Figure 3 Relative abundance and composition of bacterial taxa observed from different samples at the level of phylum

注: JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组. Others: 稀有(在各组内的平均相对丰度均<1%)及分类地位不明的细菌类群.

Note: JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group. Others: Genera with an observed mean relative abundance less than 1% and unclassified bacteria in all groups.

在属水平上, 各组样品中检测到优势菌属(平均相对丰度>1%)的结构间具有明显差异: JG 组中以弧菌属(*Vibrio*, 29.84%)、另类弧菌属(*Aliivibrio*, 23.69%)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*, 8.99%)、假黄棕杆菌属(*Pseudofulvibacter*, 7.03%)、科尔韦氏菌属(*Colwellia*, 5.42%)、小纺锤状菌属(*Fusibacter*, 4.08%)、发光杆菌属(*Photobacterium*, 2.07%)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*, 1.73%)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*, 1.59%)和弓形杆菌属(*Arcobacter*, 1.22%)为优势菌属; JW 组中以海命菌属(*Marivita*, 17.25%)占据首要优势地位, 其次是聚球藻属(*Synechococcus*, 14.55%)、黄杆菌属(*Flavobacterium*, 2.85%)、*Pontimonas* (2.26%)、嗜冷杆菌属(1.98%)和红菌属(*Rhodobium*, 1.53%); JD 组中检测出的优势菌属主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 8.55%)、固氮弧菌属(*Azoarcus*, 5.50%)、陶厄氏菌属(*Thauera*, 4.63%)、嗜盐单胞

菌属(*Halomonas*, 3.77%)、雷尔氏菌属(*Ralstonia*, 3.60%)、埃希氏菌属(*Escherichia*, 2.86%)以及芽孢杆菌属(*Bacillus*, 1.63%) (图 4)。层级聚类(基于加权 UniFrac 距离)热图分析结果显示, 三组样品被分为两大类, 其中 JG 组独为一类, JW 组和 JD 组聚为一类, 这说明与 JG 组样品相比, JW 组与 JD 组样品中菌群结构的相似度更为接近(图 5)。

## 2.4 细菌群落功能预测

PICRUSt 分析表明, 日本囊对虾肠道菌群所预测到的功能基因可注释到 KEGG 数据库中 4 条一级通路以及 17 条二级通路(平均相对丰度>1%), 其中包括: 新陈代谢(metabolism, 54.74%)类通路中的氨基酸代谢(amino acid metabolism, 12.54%)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 10.91%)、能量代谢(energy metabolism, 6.63%)、辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins, 5.35%)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism, 4.25%)、

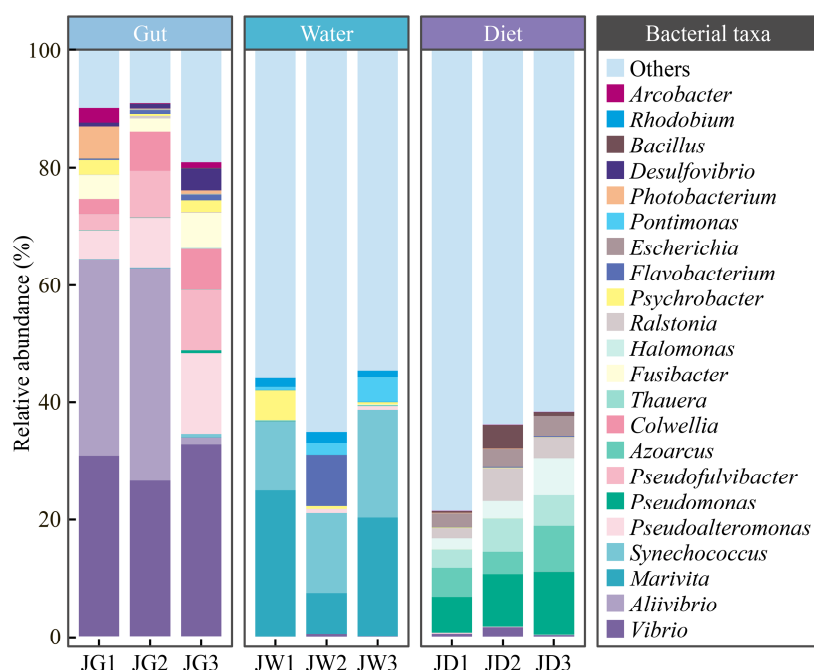


图 4 属水平上各样品中细菌类群的相对丰度和组成结构

**Figure 4 Relative abundance and composition of bacterial taxa observed from different samples at the level of genus**

注: JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组. Others: 稀有(在组内的平均相对丰度均<1%)及分类地位不明的细菌类群.

Note: JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group. Others: Genera with an observed mean relative abundance less than 1% and unclassified bacteria in all groups.

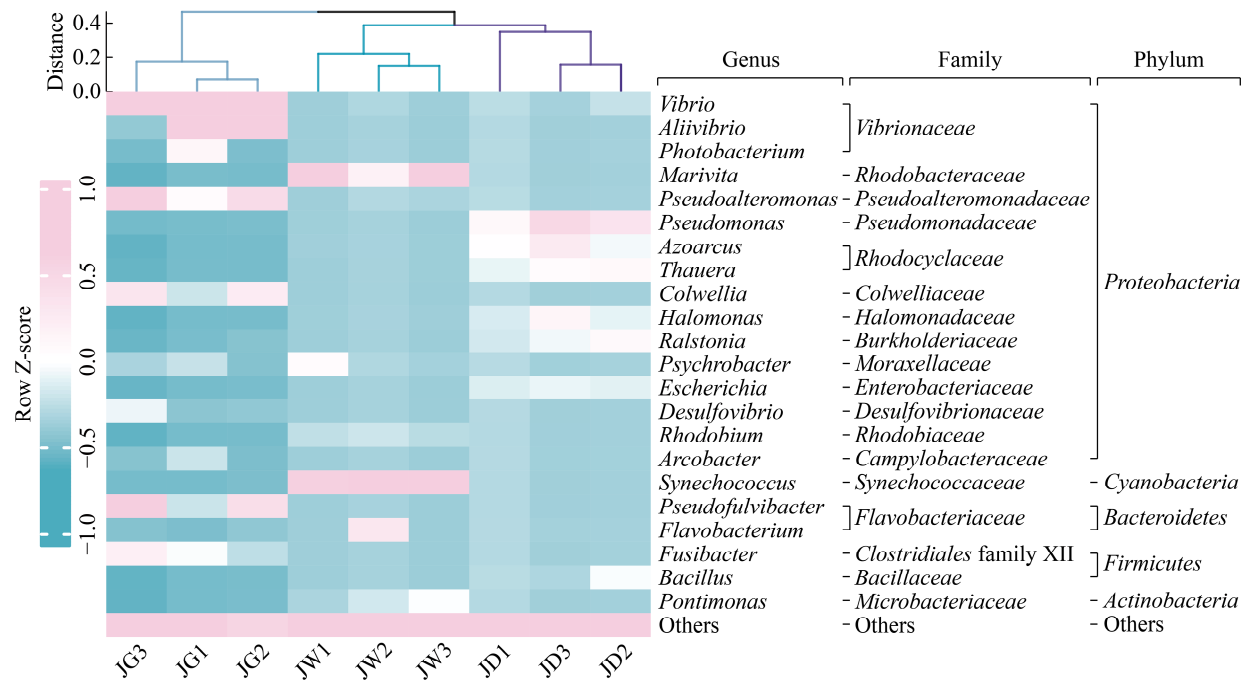


图 5 属水平上各样品中细菌类群的层级聚类热图

**Figure 5 Hierarchical cluster heatmap of bacterial taxa observed from different samples at the level of genus**

注: JG: 虾肠组; JW: 水体组; JD: 饲料组. Others: 稀有(在各组内的平均相对丰度均<1%)及分类地位不明的细菌类群. 越偏浅粉色表示相对丰度越高, 越偏湖蓝色表示相对丰度越低. 层级聚类树基于加权 UniFrac 距离.

Note: JG: Prawn gut group; JW: Water group; JD: Diet group. Others: Genera with an observed mean relative abundance less than 1% and unclassified bacteria in all groups. The closer to light pink, the higher of their relative abundance, while the closer to lake blue, the lower of their relative abundance. Hierarchical cluster tree was based on weighted UniFrac distance.

脂质代谢(lipid metabolism, 3.98%)、外源生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism, 3.13%)、多聚糖的生物合成和代谢(glycan biosynthesis and metabolism, 2.66%)、其他氨基酸代谢(metabolism of other amino acids, 2.13%); 遗传信息处理(genetic information processing, 20.61%)类通路中的复制与修复(replication and repair, 8.81%)、翻译(translation, 5.59%)、折叠分选与降解(folding, sorting and degradation, 3.13%)、转录(transcription, 3.08%); 环境信息处理(environmental information processing, 16.24%)类通路中的膜转运(membrane transport, 12.86%)、信号转导(signal transduction, 2.6%); 细胞进程(cellular processes, 5.75%)类通路中的细胞运动(cell motility, 4.80%) (图 6)。

### 3 讨论与结论

肠道是对虾体内不可或缺的消化吸收器官,其中寄居着结构复杂且数量庞大的菌群,其与宿主的健康生长息息相关<sup>[7,17]</sup>。早期有关虾类肠道菌群的研究主要依赖于纯培养法、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术和变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术等传统分子生态学研究手段<sup>[18-20]</sup>。有学者曾利用纯培养法和核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)法探究了日本囊对虾肠道细菌的群落结构,但这两种分析方法均存在各自的局限性,不能全面了解对虾肠道细菌类群的组成结构<sup>[21-22]</sup>。随着分子生物学技术的不断发展,高通量测序技术逐步替代了传统的分子



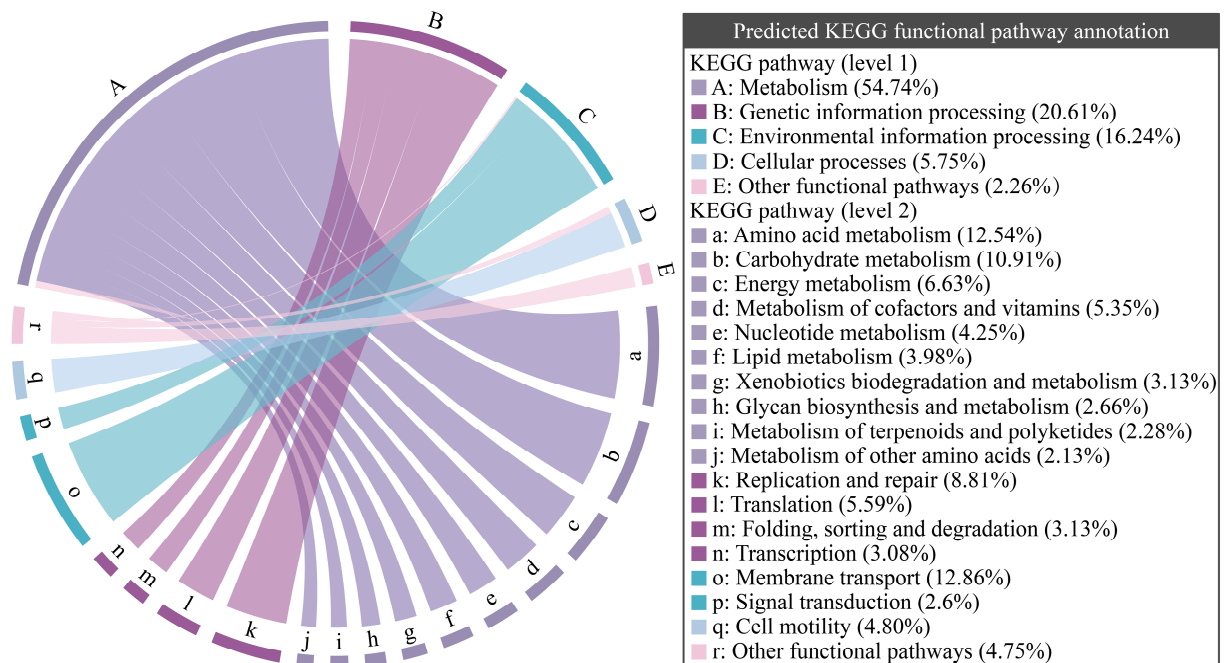


图6 日本囊对虾肠道菌群所预测到功能类别的平均相对丰度和组成结构

Figure 6 Mean relative abundance and composition of predicted functional categories of *M. japonicus* gut flora

注: Other functional pathways: 稀有功能通路(平均相对丰度<1%).

Note: Other functional pathways: Functional pathways with an observed mean relative abundance less than 1%.

生物学分析方法,且已广泛应用于虾类肠道菌群的研究中<sup>[9,12,17]</sup>。然而,至今有关日本囊对虾肠道菌群的研究仍少见报道。基于此,本文采用 16S rRNA 基因扩增子测序法分析了日本囊对虾肠道菌群的组成结构与功能作用,并探究了虾体肠道菌群与外源菌群结构间的相关性。

前人研究发现,变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门是健康虾类所共有的肠道优势菌群,这与本研究结果相一致<sup>[23-26]</sup>。本实验中,变形菌门在日本囊对虾肠道内占据首要优势地位(占比超过 75%),其中包含  $\gamma$ -变形菌纲的弧菌属、另类弧菌属、假交替单胞菌属、科尔韦氏菌属、发光杆菌属和嗜冷杆菌属,  $\delta$ -变形菌纲的脱硫弧菌属以及  $\varepsilon$ -变形菌纲的弓形杆菌属等。此外,拟杆菌门中的假黄棕杆菌属和厚壁菌门中的小纺锤状菌属是在日本囊对虾肠道中占据次要优势地位的细菌类群。上述菌属除科尔韦氏菌属外(常见于鱼类肠道内)<sup>[27]</sup>,均常见于

虾类肠道环境中,如弧菌属、假交替单胞菌属与发光杆菌属被报道为墨吉对虾(*P. merguensis*)和凡纳滨对虾共有的肠道优势菌群<sup>[18,28]</sup>,另类弧菌属、嗜冷杆菌属与弓形杆菌属被发现可存在于中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的肠道环境中<sup>[22]</sup>,而脱硫弧菌属、假黄棕杆菌属和小纺锤状菌属则可分别在 3 种对虾的肠道环境中检测到<sup>[22,29-30]</sup>。以上结果表明,不同种类对虾的肠道菌群结构间存在一定的共性。

有报道指出,水环境、饵料中的微生物群落对水生动物肠道菌群结构的形成有密切影响<sup>[31-32]</sup>。对于虾类而言,养殖水体中存在的细菌类群被证实能够干预长毛对虾(*P. penicillatus*)和凡纳滨对虾肠道菌群的结构组成,但影响程度有限<sup>[26,33]</sup>。在本研究中,水体样品与饲料样品中分别有 49.17% 及 28.65% 的 OTU 可以在日本囊对虾肠道样品中检测到。通过对 OTU 序列进行物种注释后发现,尽



管在日本囊对虾肠道、养殖水体、饲料样品中检出了许多共有的 OTU, 但它们之间绝大多数都为稀有(在各组内所占平均相对丰度均<1%)的细菌类群,而在三组样品中检测到的优势菌属结构间则有着明显差异。由此推测,本实验中日本囊对虾肠道菌群与外源菌群的结构间既存在一定关联,同时又具有相对的独立性。

肠道菌群在虾类的生理活动中起至关重要的作用,具体表现在促消化、营养吸收和免疫抗病等方面<sup>[7]</sup>。本研究中 PICRUST 预测结果显示,日本囊对虾肠道菌群的基因功能主要与新陈代谢类功能有关,包括氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢等,这也暗示肠道菌群积极参与了日本囊对虾日常的代谢过程。此外有报道指出,由凡纳滨对虾肠道内检出的弧菌属和假交替单胞菌属可产生多种细胞外酶(如淀粉酶、脂肪酶、几丁质酶等),对饵料具有潜在的消化能力<sup>[23,28]</sup>。这提示本研究中于日本囊对虾肠道内检测到的高丰度弧菌属(最优势菌属)与假交替单胞菌属(第三优势菌属)可能在虾体摄入营养物质的消化代谢过程中发挥了关键作用,但是否能够作为对虾潜在的益生菌应用于水产养殖中,还有待更为深入的研究。

综上所述,可以得出以下结论:(1) 日本囊对虾与其他种类对虾的肠道菌群结构间存在共性。(2) 养殖水环境和饵料中的菌群在一定程度上干预了日本囊对虾肠道菌群结构的形成。(3) 肠道菌群在日本囊对虾的日常代谢活动中发挥了一定的作用。

## REFERENCES

- [1] Fu Y, Li HP, Ren SY, et al. Differences in quantitative morphology of *Marsupenaeus japonicus* between wild and cultivated populations offshore Zhoushan, East China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 91-98 (in Chinese)  
富裕, 李鸿鹏, 任凤艺, 等. 舟山近海日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)野生群体与露天养殖越冬群体间的形质差异[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 91-98
- [2] Han L, Wang XH, Yang B, et al. Analysis of pathogen in an outbreak death of *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 431-441 (in Chinese)  
韩琳, 王秀华, 杨冰, 等. 一例日本囊对虾暴发性死亡的病原分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 431-441
- [3] Fisheries and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. 2019 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019 (in Chinese)  
农业农村部渔业渔政管理局. 2019 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019
- [4] Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933-18938
- [5] Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 56-64
- [6] Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, et al. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ[J]. *Molecular Endocrinology*, 2014, 28(8): 1221-1238
- [7] Wang JX. The gut and hemolymph microbiotas of crustacean, composition, functions and homeostatic regulation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5): 760-772 (in Chinese)  
王金星. 对虾等甲壳类动物肠道与血淋巴菌群的组成、功能与动态平衡调控[J]. *微生物学报*, 2018, 58(5): 760-772
- [8] Luo P, Hu CQ, Xie ZY, 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)  
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
- [9] Ye HB, Fan Y, Wang XL, et al. Effects of three biological agents on intestinal microbiota of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a water-recirculating cultivation system[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1647-1657 (in Chinese)  
叶海斌, 樊英, 王晓璐, 等. 循环水养殖系统中凡纳滨对虾肠道微生物对三种复合益生菌制剂的响应[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1647-1657
- [10] Zhang ML, Sun YH, Liu YK, et al. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 72-80
- [11] Qiao F, Liu YK, Sun YH, et al. Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(3): 444-452
- [12] Gainza O, Ramírez C, Ramos AS, et al. Intestinal microbiota of white shrimp *Penaeus vannamei* under

- intensive cultivation conditions in Ecuador[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 75(3): 562-568
- [13] Lin M, Zeng CX, Li ZQ, et al. Comparative analysis of the composition and function of fecal-gut bacteria in captive juvenile *Crocodylus siamensis* between healthy and anorexic individuals[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019(8): e929
- [14] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [15] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [16] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821
- [17] Zheng YF, Yu M, Liu JW, et al. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1362
- [18] Oxley APA, 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
- [19] Li K, Zheng TL, 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)  
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
- [20] Liu HD, Wang L, Liu M, et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses[J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1/4): 32-36
- [21] Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate[J]. *Aquaculture*, 1980, 19(3): 229-234
- [22] Liu HD. Composition and variation of intestinal microbiota in marine shrimp analyzed by molecular microbial ecological methods[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘淮德. 应用微生物分子生态学方法研究对虾肠道细菌组成及其变化规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010
- [23] Tzuc JT, Escalante DR, Herrera RR, et al. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Springer Plus*, 2014, 3: 280
- [24] Yu WN, Dai WF, 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)  
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
- [25] Rungrasamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, et al. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91853
- [26] Wang CZ, Lin GR, 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): 714-720 (in Chinese)  
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): 714-720
- [27] Li YY, Ren M, Zhang CY, et al. Culturable bacterial diversity in intestine of farmed juvenile puffer fish *Takifugu rubripes*[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(10): 652-656 (in Chinese)  
李艳宇, 任盟, 张丛尧, 等. 红鳍东方鲀稚鱼肠道可培养细菌的多样性[J]. *水产科学*, 2015, 34(10): 652-656
- [28] Gao S, Pan LQ, Huang F, et al. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 499: 109-118
- [29] Deng XY, Zhang B, Tang H, et al. Analysis of microbial diversity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by MiSeq high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2018, 39(24): 149-155 (in Chinese)  
邓晓影, 张宾, 汤贺, 等. 基于高通量测序的南美白对虾中微生物群落分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 149-155
- [30] Mongkol P, Bunphimpapha P, Rungrasamee W, et al. Bacterial community composition and distribution in different segments of the gastrointestinal tract of wild-caught adult *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 378-392
- [31] Xiong XY, Wang XF, Peng YH, et al. Variance analysis of intestinal bacterial community between healthy and diseased *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1317-1325 (in Chinese)  
熊向英, 王贤丰, 彭银辉, 等. 健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群结构的差异[J]. *水产学报*, 2019, 43(5): 1317-1325
- [32] Ma C, Chen CX, Jia L, et al. Comparison of the intestinal microbiota composition and function in healthy and diseased Yunlong Grouper[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 187
- [33] Huang F, Pan LQ, Song MS, et al. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(19): 8585-8598