

长毛对虾海水养殖环境以及虾肠道微生物群落结构研究

王春忠¹, 林国荣², 严 涛³, 郑志鹏⁴, 欧清峰⁴, 陈 斌⁴, 孙富林^{3*}

(1. 福建省莆田市水产科学研究所, 福建 莆田 351100;

2. 莆田学院, 福建 莆田 351100;

3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

4. 莆田市天然星农业开发有限公司, 福建 莆田 351100)

摘要: 为了研究长毛对虾养殖环境以及对虾肠道微生物种群结构的特征, 实验分别采集养殖区进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体以及长毛对虾肠道样品, 采用构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法对不同样品间的微生物群落组成进行了研究。结果表明, 4 组样品中共获得 621 条序列, 操作分类单元(OTU)总数达 212 个, 表明养殖环境微生物群落结构具有高度的多样性。从遗传进化树分析发现, 进水口水体中细菌优势种群为蓝细菌(53.97%)、 α -变形杆菌(13.76%)和 γ -变形杆菌(10.58%); 养殖池水体细菌优势种群为蓝细菌(33.55%)、 γ -变形杆菌(14.84%)、厚壁菌(14.19%)、拟杆菌(12.26%)和 α -变形杆菌(9.68%); 养殖池底泥细菌优势种群大部分属于厚壁细菌(79.12%); 对虾肠道细菌优势种群为厚壁细菌(75.79%)、梭杆菌(13.68%)和 γ -变形杆菌(10.53%)。在目分类水平上, 养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道中芽孢杆菌占有较高的比例, 分别占克隆数的 69.78%、13.55% 和 72.63%; 进水口水体和养殖池水体中红细菌的比例较高, 分别占克隆数的 10.05% 和 9.68%。本研究分析了养殖环境以及对虾肠道微生物的群落结构, 揭示微生物从水源到对虾肠道内的演替规律。总体上, 本养殖系统微生物群落结构良好, 但在养殖池水体和对虾肠道中也检测到黄杆菌类群和少量的弧菌。本研究有助于了解养殖环境对于对虾肠道微生物组成的影响, 并为长毛对虾病害的预防提供参考。

关键词: 长毛对虾; 细菌群落; 16S rRNA 基因文库; 海水养殖系统

中图分类号: Q 938.1; S 917.1

文献标志码: A

长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)广泛地分布于热带和亚热带区域, 在中国主要分布于福建和广东省沿海, 是南部沿海各省主要的养殖对象, 被认为是具有重要经济价值的对虾品种。但是近年来, 对虾养殖业由于缺乏有效管理而引起各种微生物疾病的发生, 如红腿病、黑鳃病、软壳病等。

细菌在水产动物肠道中的作用已越来越多地引起人们重视, 其在宿主动物的肠道发育、营养、免疫应答和疾病抗性中发挥独特的作用^[1-2]。一些有益共生菌可以预防炎症性疾病^[3-4]。同时动物肠道内也寄居着致病性细菌, 其过度生长可以打乱肠道微生物菌群的平衡, 从而导致宿主免疫

系统的缺失或损坏肠粘膜屏障^[5-6]。

近年来, 包括甲壳类在内的水生动物的肠道微生物多样性得到了广泛的研究, 大多数的研究集中在使用有益菌对水产养殖动物疾病的影响以及宿主的免疫应答^[7-9], 还有特定种群对养殖水环境的影响^[10-11]。利用分子生物学方法研究对虾养殖区微生物群落结构也比较多^[12-14]。但养殖环境对动物肠道微生物组成的影响研究甚少, 长毛对虾肠道微生物及其与养殖环境的关系还未见报道。本实验通过构建细菌 16S rRNA 基因文库的方法来研究养殖区进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体以及对虾肠道内细菌群落组成情况,

收稿日期:2013-12-23

修回日期:2014-03-05

资助项目:国家科技富民强县专项行动计划(国科发农[2012]745号);福建省科技厅区域重大项目(2013N3004);莆田市科技计划区域重点项目(2012S14)

通信作者:孙富林, E-mail: flsun@scsio.ac.cn

<http://www.scxuebao.cn>

比较不同样品微生物组成结构的差异,分析养殖环境在对虾肠道微生物结构中所起的作用,揭示微生物从水源到对虾肠道内的演替规律,为预防对虾疾病提供必要的参考数据。

1 材料与方法

1.1 采样地点

样品采集于福建省莆田市后海垦区对虾养殖区,养殖池面积 3.33 hm^2 ,平均水深 1 m,泥沙底质,泥:沙比例 81:19。采样 8 号养殖池 2013 年 6 月 12 日投入本地海区野生长毛对虾虾苗 (1.8 ± 2.1) cm 20 万尾,池底套养硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*),每天根据天气及上次摄食情况投喂人工配合饲料。2013 年 9 月 17 日,用罾网捕获养殖池的长毛对虾 36 条,平均体长 11.7 cm,平均体质量 19.2 g。同时采用抓斗式采泥器采集底泥样品(H4),无菌采集 0~4 cm 泥样。养殖区进水口水体(H11)和养殖池水体(H12)用有机玻璃采水器采集,先预过滤除去大颗粒物质,再用孔径为 $0.2 \mu\text{m}$ 的聚碳酸酯膜过滤,将滤膜用锡箔纸包好保存。在无菌条件下剖取长毛对虾肠道(H25),再用灭菌的镊子取出肠道内的粪便等杂物,将对虾肠道置于灭菌离心管中。所有样品保存于 -80°C 超低温冰箱以备 DNA 提取。

1.2 DNA 提取

无菌条件下取出滤膜,剪碎后放置于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L Na_2EDTA ,pH 8.0)和 25 μL 溶菌酶,37 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h。再加入 50 μL 0.5 mol/L EDTA,10 μL 蛋白酶和 25 μL 20% SDS,56 $^\circ\text{C}$ 放置 12 h。离心,将上清液转移至另一离心管中,沉淀中再加入 500 μL TE 缓冲液,涡旋振荡,合并上清液。加入总体积 1/3 的 NH_4Ac (7.5 mol/L),倒入微型离心柱,离心。2 次加入洗脱液(0.1 mmol/L pH 7.5 的 Tris-Cl 与无水乙醇 1:4 混合),离心,晾干离心柱。加入 40 μL 超纯水,室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 2 min 收集滤液, -20°C 保存备用。称取 1 g(湿重)底泥和肠道内容物样品,参照土壤核酸提取试剂盒(OMEGA 公司)说明步骤提取总 DNA。

1.3 16S rRNA 基因扩增

PCR 扩增于热循环仪上进行(PTC-200, Bio-Rad 公司)。先采用通用引物 27F 和 1492R^[15] 扩

增细菌 16S rRNA 全长。以此 PCR 产物为模板采用引物 341F 和 907R 进行二次扩增^[16]。PCR 反应体系:10 $\times$ PCR buffer 5 μL (含 20 mmol/L MgCl_2),引物 F341 和 R907 各 20 pmol, dNTPs 5 mmol/L 4 μL ,模板约 1 μL ,Taq 酶 1.25 U (TaKaRa 公司),3 000 ng 的 BSA(牛血清白蛋白),加超纯水至 50 μL 。PCR 反应参数:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;34 个循环的 94 $^\circ\text{C}$ 1 min,55 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4 细菌 16S rRNA 基因文库的构建

PCR 产物经纯化后,经 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选。采用 T 载体通用引物进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小,将含有合适片段大小的阳性克隆进行测序,将得到的序列登录到 NCBI 数据库,得登录号 KF972544-KF973164。

对所获的序列通过 BLAST 程序在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行相似细菌搜索,运用 Clustalx 1.8 软件,按照最大同源性的原则进行多重序列比对。使用 MEGA 5.0 软件,通过 p-distance 算法,以邻位连接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.5 数据分析

用 Mothur 软件对所得序列进行分析,以 95% 相似性为标准划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),同时对物种的丰富度指数(Chao 1)、香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Simpson index)以及覆盖率(coverage)进行计算^[17]。为了评估不同样品细菌群落结构多样性,采用 SPSS 18.0 软件对不同样品 OTU 数据进行多维尺度分析(multidimensional scaling, MDS),创建多维空间感知图,图中的点(对象)的距离反映了样品间的相似性或差异性(不相似性)。群落相似性采用 Jaccard 指数: $Cs = c / (a + b - c)$,式中: a 为 A 群落物种数, b 为 B 群落物种数, c 为 A、B 2 群落共有的物种数。

2 结果

2.1 细菌 16S rDNA 文库序列多样性

分别挑选阳性克隆子,对插入片段进行测序。进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道中分别测得 189、182、155 和 95 条有效序列。通过 Mothur 软件分析,以 95% 相似性水平为标准

划分 OTU, 总共得到 212 个有效 OTU。表 1 所示, 进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道分别测得 68、69、54 和 21 个 OTU, 覆盖率分别为 73.5%、66.4%、75.5% 和 89.4%, 表明挑取的单克隆子数量已基本能够反映样品文库中优势细菌类群的数量关系。养殖池底泥细菌文库 Chao 指数为 435, 高于进水口水体 (162.3)、养殖池水体 (154.4) 和对虾肠道 (27.42); 通过计算香农指数及辛普森指数分析细菌的多样性, 养殖池水体细菌香农指数 (3.20) 最高, 辛普森指数 (0.069) 最低, 表明养殖池水体细菌多样性最高。

表 1 基于 16S rDNA 序列的细菌生态多样性指数
Tab.1 The ecological indexes of bacterial communities of four samples based on 16S rDNA sequences

样品 sample	操作分 类单元 OTU	香农 指数 Shannon	辛普森 指数 Simpson	覆盖率/% coverage	物种丰富 度指数 Chao
H11	68	2.94	0.173	73.5	162.3
H4	69	2.58	0.285	66.4	435.0
H12	54	3.20	0.069	75.5	154.4
H25	21	2.08	0.210	89.4	27.4

2.2 对虾养殖系统细菌遗传多样性分析

对 4 组样品的序列进行了系统发育分析, 构建遗传发育进化树, 比较不同样品序列所对应的微生物种群在样品中的丰度。由图 1 和图 2 可知, 厚壁菌门 (Firmicutes) 在 4 个样品中是占绝对优势的微生物种群, 在养殖池底泥和对虾肠道中的丰度优势最为明显, 分别有 144 和 72 个克隆子, 占 79.12% 和 75.79%; 在养殖池水体克隆文库中有 22 个克隆子, 占 14.19%。在进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道克隆文库中各有 25.93%、8.79%、27.10% 和 10.53% 的克隆子属于变形杆菌 (Proteobacteria)。除厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形杆菌门 (Proteobacteria) 外, 进水口水体、养殖池底泥和养殖池水体克隆文库中还含有拟杆菌门 (Bacteroidetes) 细菌, 所占比例分别为 8.47%、2.75% 和 12.26%。进水口水体和养殖池水体克隆文库还含有优势的蓝细菌 (Cyanobacteria), 所占比例分别为 53.97% 和 33.55%。在细菌目分类水平上, 进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道克隆文库中芽孢杆菌 (Bacillales) 所占比例分别为 2.65%、69.78%、13.55% 和 72.63%。进水口水体和养殖池水体克隆文库还含黄杆菌目 (Flavobacteriales) 细菌, 所占比例分别为 6.35% 和

10.32%。对虾肠道中梭杆菌 (Fusobacteriales) 所占比例为 13.68%。进水口水体、养殖池底泥和养殖池水体克隆文库还含有红细菌 (Rhodobacterales), 所占比例分别为 10.05%、2.20% 和 9.68%。除此之外, H11、H4 和 H12 中分别有 65.08%、23.63% 和 61.94% 的 OTU 在目水平上不能确定到种群。

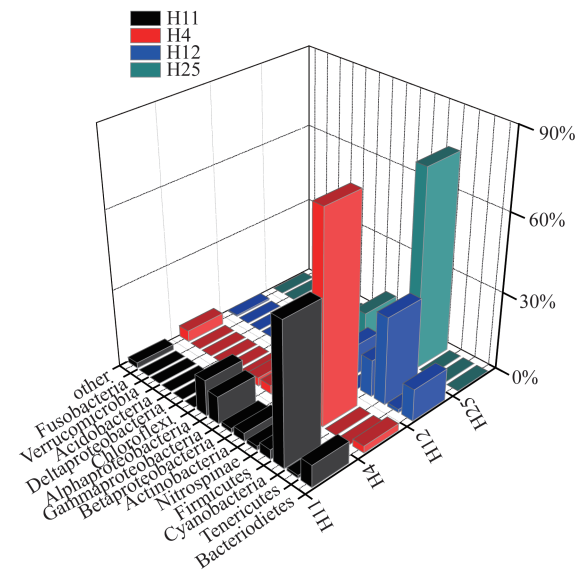


图 1 在门分类水平样品中细菌种群结构及其相对丰度

Fig.1 The relative abundance of bacterial community structure at the phylum level

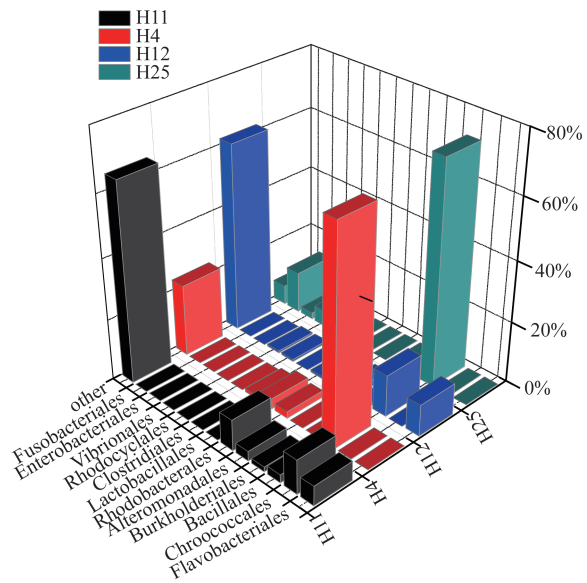


图 2 在目分类水平样品中细菌种群结构及其相对丰度

Fig.2 The relative abundance of bacterial community structure at the order level

2.3 4 组样品细菌群落结构比较

运用 MDS 方法比较不同样品的细菌群落结构的相似性, MDS 图中的点代表不同的样品, 样品之间距离的远近说明群落结构的相似程度。本实验 MDS 压力值为 0.086, 说明 MDS 结果可以较好地代表不同数据间的差异; 4 个样品相互间距离较远, 说明进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道细菌种群结构差异性较大(图 3)。4 个样品细菌群落间的 Jaccard 相似性系数为 0~0.067, 共有的 OTU 数目极少, 也表明进水口水体、养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道间细菌群落相似性低。

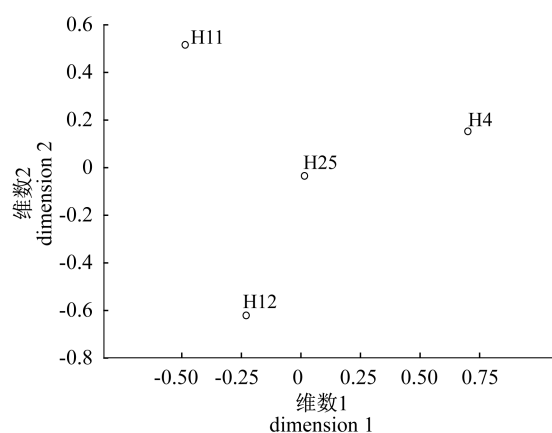


图3 样品细菌群落结构的多元尺度分析

Fig.3 Two-dimensional plots of MDS analysis based on 16S rRNA gene to compare broad-scale differences among bacterial communities

3 讨论

研究发现, 虾肠道微生物组成一方面受到宿主的影响, 另一方面, 养殖环境在其群落组成的塑造上也起着重要的作用^[18], 肠道微生物种群源于宿主的生存环境^[19-21]。但本研究通过养殖环境和对虾肠道样品克隆文库的比较发现, 对虾肠道与进水口水体只有 2 个相同的 OTU, 与养殖池底泥样品只有 1 个相同的 OTU, 而与养殖池水体不存在共同的 OTU, 这些说明了对虾肠道微生物与其环境间细菌群落结构相似度低, 微生物种群结构存在着巨大的差异; 本实验中养殖环境对肠道微生物组成的贡献不大, 这与 Chaiyapechara 等^[22]研究肠道微生物的组成时得出的结果相似。养殖池水体和对虾肠道微生物群落较低的相似性, 可能是对虾海水养殖过程中受到人为因素的

影响。

本研究结果显示, 厚壁细菌 (Firmicutes) 是养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道最丰富的微生物种群, 其次变形杆菌 (Proteobacteria) 也占有较大的比重, 其他肠道微生物的研究中也发现类似的结果^[22-23]。在海水养殖系统中 γ -变形杆菌 (Gamma-proteobacteria) 是动物肠道中的优势微生物种群^[24,5]; 本研究测得 γ -变形杆菌在进水口水样、养殖池底泥样、养殖池水体以及对虾肠道微生物群落中分别占总数的 10.58%、3.30%、14.84% 和 10.53%; α -变形杆菌 (Alpha-proteobacteria) 在进水口水体、养殖池底泥样和养殖池水体中分别占克隆数的 13.76%、3.30% 和 9.68%, 也是优势的微生物种群, 但在养殖池底泥中仅有 3.3% 被检测到, 在对虾肠道内则没有检出, 说明 α -变形杆菌不易生存于底泥和对虾肠道内, 其原因需待研究。在进水口和养殖池的水样中, 蓝细菌 (Cyanobacteria) 是占 OTU 数目最多的类群, 分别占 OTU 总数的 53.97% 和 33.55%, 可能是近岸和养殖环境水体较浅, 光照强并且营养盐含量高, 有利于蓝细菌的繁殖。但有研究表明非毒性蓝藻的聚集可以降低虾对桡足类的摄食率^[25], 一些有毒的蓝藻可能引发虾类疾病并导致死亡, 本实验的蓝细菌对养殖长毛对虾及其他生物的影响有待进一步研究探讨。

本研究中红细菌 (Rhodobacterales) 在进水口水体和对虾养殖池水体中是占优势的微生物种群。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^[26], 降低大菱鲆幼鱼的死亡率^[27]。Ruiz-Ponte 等^[28]发现, 添加玫瑰杆菌 (*R. gallaeciensis*) 的细胞提取物能增强扇贝幼虫的存活率。本研究中对虾养殖系统内红细菌具有较高的丰度, 有利于养殖区长毛对虾的健康生长。本研究中弧菌 (Vibrionales) 在养殖水体只存在 1 个 OTU, 在对虾肠道内只检测到 5 个 OTU; 从遗传发育分析结果来看, 这些 OTU 同美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium* sp.) 和弧菌 (*Vibrio* sp.) 遗传距离相近。而以前的研究中, 美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*) 和哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 的菌株被鉴定为具有强烈的致病性^[6,29]。本研究中弧菌在养殖水体和对虾肠道内数量很

少,对本研究的养殖系统健康不会造成太大的影响。

有益菌可以抑制致病菌在动物肠道内的增殖,可以提高黑虎虾(*Alpheus bellulus*)的免疫力^[30]。乳酸菌(*Lactobacillus* 和 *Lactococcus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)在水产养殖中都是已报道的重要的生物控制剂^[31]。本研究中4个样品中都有检出芽孢杆菌,并在养殖池底泥、养殖池水体和对虾肠道中都是占绝对优势的微生物种群,分别占到总 OTU 的 69.78%、13.55% 和 72.63%,比进水口水体的 2.75% 高出很多。乳酸杆菌目(*Lactobacillales*)在样品中含量很少,只在养殖池底泥和养殖池水体中占总量的 3.30% 和 0.65%。以上结果说明,本研究中养殖系统内存在着大量的有益微生物,这些有益菌在抑制病原微生物以及维持养殖环境的生态平衡等方面起着重要的作用。

另外,在进水口水体中检测到 6.35% 的黄杆菌目(*Flavobacteriales*)细菌类群,在养殖池水体中其含量达到 10.32%。在水生动物体内,一些黄杆菌种类是潜在的条件致病菌^[32],其在养殖水体中的大量存在,可能增加对虾感染疾病的风险。生产养殖户应加强养殖管理,保持良好的水质环境,采取有效措施防止其大量的繁殖而造成虾病害的发生。

4 结论

本研究通过构建 16S rRNA 基因文库的方法比较了长毛对虾养殖系统微生物群落结构组成,克隆文库中大量的 OTU 表明系统内微生物群落具有高度的多样性。养殖环境内存在大量的有益菌,同时也有潜在的条件致病菌。本研究对于发展健康的对虾养殖环境以及优化养殖系统内微生物群落结构具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] Austin B. The bacterial microflora of fish[J]. The Scientific World Journal, 2006, 181(6): 931–945.
- [2] Rawls J F, Samuel B S, Gordon J I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(13): 4596–4601.
- [3] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5): 313–323.
- [4] Sonnenburg J L, Chen C T, Gordon J I. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host[J]. PLoS Biology, 2006, 4(12): e413.
- [5] Oxley A P, 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.
- [6] Wang F I, Chen J C. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress[J]. Aquaculture, 2006, 258(1–4): 34–41.
- [7] Liu C H, Cheng W, Hsu J P, et al. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 61(1–2): 169–174.
- [8] Ziaei-Nejad S, Rezaei M H, Takami G A, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252(2–4): 516–524.
- [9] de-la-Re-Vega E, García-Galaz A, Díaz-Cinco M E, et al. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(3): 405–408.
- [10] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P, et al. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize[J]. Aquaculture, 2003, 219(1–4): 393–411.
- [11] Abraham T J, Ghosh S, Nagesh T S, et al. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India[J]. Aquaculture, 2004, 239(1–4): 275–288.
- [12] Li K, Zheng T L, Tian Y, et al. Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 649–653. [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. 微生物学报, 2007, 47(4): 649–653.]

- [13] Li Z Y, He L M, Wu J, *et al.* Study on the predominant bacterial community in prawn based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint[J]. Microbiology China, 2005, 32(3): 82 – 86. [李志勇, 何丽明, 吴杰, 等. 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌组成分析. 微生物学通报, 2005, 32(3): 82 – 86.]
- [14] Luo P, Hu C Q, Xie Z Y, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(2): 49 – 53. [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. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 49 – 53.]
- [15] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 625 – 630.
- [16] Casamayor E O, Pedrós-Alió C, Muyzer G, *et al.* Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1706 – 1714.
- [17] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537 – 7541.
- [18] Wang F, Yang J F, Chen J G, *et al.* Comparison of the bacterial community structure in the crab seawater cultured and the outside environment by PCR-DGGE fingerprint technique; *Portunus trituberculatus* and *Scylla serrata* [J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(4): 59 – 64.
- [19] Han S, Liu Y, Zhou Z, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences[J]. Aquaculture Research, 2010, 42(1): 47 – 56.
- [20] Cahill M M. Bacterial flora of fishes; a review [J]. Microbial Ecology, 1990, 19(1): 21 – 41.
- [21] Wu S, Wang G, Angert E R, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine [J]. PloS one, 2012, 7(2): e30440.
- [22] Chaiyapechara S, Rungrasamee W, Suriyachay I, *et al.* Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms [J]. Microbial Ecology, 2012, 63(4): 938 – 953.
- [23] Rungrasamee W, Klanchui A, Chaiyapechara S, *et al.* Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages [J]. PloS one, 2013, 8(4): e60802.
- [24] Liu H, 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.
- [25] Engström J, Viherluoto M, Viitasalo M. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on grazing, zooplanktivory and survival of the mysid shrimp *Mysis mixta* [J]. Journal of experimental marine biology and ecology, 2001, 257(2): 269 – 280.
- [26] Hjelm M, Riaza A, Formoso F, *et al.* Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and Vibrionaceae strains in a turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7288 – 7294.
- [27] 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.
- [28] Ruiz-Ponte C J, Samain J F, Sanchez J L, *et al.* The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae [J]. Marine Biotechnology, 1999, 1(1): 52 – 59.
- [29] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(5): 671 – 681.
- [30] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271 – 288.
- [31] Kolindadacha O D, Adikwu I A, Okaeme A N, *et al.* The role of probiotics in aquaculture in Nigeria-a review [J]. Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2011, 5(1): 8 – 15.

- [32] 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.

Microbial community in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestine and its culture environment

WANG Chunzhong¹, LIN Guorong², YAN Tao³, ZHENG Zhipeng⁴,
OU Qingfeng⁴, CHEN Bin⁴, SUN Fulin^{3*}

(1. Putian Institute of Aquaculture Science of Fujian Province, Putian 351100, China;

2. Department of Environment and Life Sciences, Putian University, Putian 351100, China;

3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

4. Putian Tian Ran Xing Agriculture Development Co. Ltd., Putian 351100, China)

Abstract: To investigate bacterial communities and diversity in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestinal and culture-associated environment, 16S rRNA clone library analysis was performed. The results demonstrated that there were obvious differences in the bacterial compositions of the outside seawater, culture system and the shrimp intestine. The comparison analysis revealed that the bacterial community had high diversity among the samples. The results also showed that the intestinal microbial community of shrimp had lower diversity than those from the culture-associated environments. Cyanobacteria (53. 97%), Alpha-proteobacteria (13. 76%) and Gamma-proteobacteria (10. 58%) constituted the dominant components of the outside seawater samples. Cyanobacteria (33. 55%), Gamma-proteobacteria (14. 84%), Firmicutes (14. 19%), Bacteroidetes (12. 26%) and Alpha-proteobacteria (9. 68%) were the dominant bacteria groups in culture water. Culture sediments were mainly dominated by Firmicutes (79. 12%). Firmicutes (75. 79%), Fusobacteria (13. 68%) and Gamma-proteobacteria (10. 53%) were dominant in the shrimp intestine. The order of Bacillales occupied a higher proportion of bacterial community in culture sediments (69. 78%), culture water (13. 55%) and the shrimp intestinal tract (72. 63%), which may play an important role in the maintenance of healthy culture system. An important bacteria group, Rhodobacterales was also dominant in outside water (10. 05%) and culture water samples (9. 68%). In addition, outside seawater and culture water harbored higher diversity of bacterial community than the shrimp intestine and culture sediments, and had more potential pathogens, such as Flavobacteria (10. 32%) and Fusobacteriales (13. 68%). This study will increase our understanding about the effects of culture environment on bacterial community composition in the shrimp intestine and provide valuable data for the development of prevention mechanisms for shrimp cultivation.

Key words: *Penaeus penicillatus*; microbial community; 16S rRNA gene library; marine culture system

Corresponding author: SUN Fulin. E-mail: flsun@scsio.ac.cn