

文章编号: 1000-0615(2018)12-1967-10

DOI: 10.11964/jfc.20180211184

高通量测序法分析两株益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响

尚碧娇, 左志晗*, 窦春萌, 李文悦, 孙金生*

(天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要: 为分析荚膜红细菌和蜡样芽孢杆菌2株益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响, 本实验对凡纳滨对虾进行为期30 d的养殖饲喂实验, 饲喂后期利用高通量测序凡纳滨对虾肠道微生物的16S rDNA V4区, 来分析不同益生菌饲喂后凡纳滨对虾肠道菌群的结构特征, 并结合对虾体质量增加率和攻毒后累计死亡率的宏观指标来进行分析。结果显示: ①空白组(CK)、荚膜红细菌组(Rc)和蜡样芽孢杆菌组(Bc)样品OTU范围为374~506, 其中CK组对虾肠道菌群OTU数量最低, 饲喂益生菌后的2组对虾肠道菌群中OTU数量相对较高; ②在门分类水平上, 3组的变形菌门数均为最多, CK组主要为变形菌门和少量拟杆菌门, Bc组主要有变形菌门、拟杆菌门、无壁细菌门、厚壁细菌门和假单胞菌, Rc组主要是变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、酸杆菌门、放线细菌、梭杆菌门和蓝细菌; ③稀释曲线和Shannon指数结果可见, CK组样品物种丰度和复杂度最低, 且Bc组样品丰度和复杂度相对较高; ④PCA分析发现, Rc组和CK组样品微生物组成较为接近, 结合宏观对虾体质量增加率和攻毒后累计死亡率的结果分析, 可见相较于荚膜红细菌, 蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道微生物菌群影响更显著, 且益生效果更佳。研究表明, 饲喂益生菌可以扩增对虾肠道微生物菌群丰度, 并能抑制弧菌属等有害菌群的生长, 提高对虾体质量增加率并降低死亡率, 从而达到益生效果, 其中以饲喂蜡样芽孢杆菌菌株效果更佳。

关键词: 凡纳滨对虾; 荚膜红细菌; 蜡样芽孢杆菌; 高通量测序; 肠道菌群

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的水产养殖品种, 具有较高的经济价值和营养价值。但是近年来随着集约化养殖的扩大, 对虾在养殖中开始频繁暴发各种疾病, 传统防治措施是使用大量抗生素, 虽然在一定程度上控制了疾病的发生, 但是其导致的病原菌耐药性问题和药物残留问题引发了新一轮的挑战。鉴于益生菌具有应用后在体内无残留也无耐药性产生的特质, 有望替代抗生素用于水产动物

疾病的防治^[1]。国内外现已有多篇益生菌应用于水产动物养殖的报道, 王晓琳^[2]评价了2株潜在益生菌的安全性, 并探究了其对凡纳滨对虾生长和免疫相关酶活性的影响; 李桂英等^[3]分析了饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾部分免疫酶活性的影响。目前的研究多集中于饲喂益生菌对水产动物的宏观益生效果分析及免疫酶活性的测定, 然而益生菌是如何提高水产动物免疫力的微观作用机理现已成为学者研究的热点。

收稿日期: 2018-02-13 修回日期: 2018-04-06

资助项目: 国家自然科学基金(31472299); 天津市自然科学基金(15JCZDJC33800); 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目(ITTFRS2017007); 天津市高等学校创新团队建设规划(TD13-5076); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA092205, 2012AA10A401); 国家“九七三”重点基础研究项目(2012CB114405)

通信作者: 左志晗, E-mail: zhizhanuo@163.com; 孙金生, E-mail: jinshsun@163.com

近年来, 宏观基因组学技术的发展避开了传统微生物分离培养方法的弊端, 为直接从测试样品中提取总DNA, 运用相关软件对其全部序列进行相应分析, 完整地反映被测样品中全部微生物的群落特征^[4]。高通量测序能更灵敏地探测包括稀有微生物在内的环境微生物的多样性, 可实现宏观基因组水平上多重样品间的平行比较研究, 极大地拓展了微生物生态学研究的广度和深度。随着现代测序技术的快速发展, 研究者已将高通量测序技术成功应用于多个学科领域, 如土壤多样化、海洋和肠道环境、发酵食品、人类健康与疾病等^[5]。目前, 关于虾类微生物菌群的研究, 绝大部分集中于养殖水体微生物多样性、虾肠道微生物菌群结构及冷冻虾类产品中细菌菌群结构等, 而关于益生菌饲喂后对虾肠道菌群变化情况的文章还鲜见报道^[6-7]。

本实验以荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus* strain PSB-03, FJ866782.1)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* strain N419, JN400121.1)2株菌为实验用益生菌株, 设置空白组(CK)、荚膜红细菌组(Rc)和蜡样芽孢杆菌组(Bc)3个实验组, 对凡纳滨对虾进行为期30 d的养殖饲喂实验, 饲喂后期利用高通量测序对2个益生菌实验组和空白对照组对虾肠道微生物的16S rDNA V4区进行分析, 并结合对虾体质量增长率和病原菌副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, JGB080708-1)攻毒后的累计死亡率2个指标进行讨论, 旨在研究不同益生菌饲喂凡纳滨对虾后其肠道微生物菌群结构的变化, 并结合宏观益生效果, 分析饲喂不同益生菌对凡纳滨对虾肠道原有微生物菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康凡纳滨对虾取自天津汉沽鑫永丰凡纳滨对虾养殖基地; 荚膜红细菌菌株和蜡样芽孢杆菌菌株均为本实验室前期从健康凡纳滨对虾肠道筛选出来的益生菌, 2株均为兼具抑菌活性及外泌消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)活性的凡纳滨对虾肠道菌株; 副溶血性弧菌菌株为本实验室保存菌株。

1.2 实验方法

饲喂方法 实验用凡纳滨对虾在天津市

汉沽鑫永丰对虾养殖基地进行养殖。将2株益生菌菌株在LB液体培养基中扩大培养制备发酵液, 按饲料的2%添加, 使饲料中细菌的浓度为 $3\sim 6\times 10^7$ CFU/g, 现用现配。实验分为3组, 每组投放600尾对虾, 随机设置3个重复, 每个重复200尾, 按凡纳滨对虾体质量的5%投放饲料, 每天投喂2次。注意水质的变化, 温度 $24\sim 28$ °C, 盐度 28 ± 2 , pH 8.0 ± 0.5 , 连续曝气, 每日进行对半换水, 以此方法饲喂30 d。

凡纳滨对虾体质量增加率 实验开始前, 每组养殖池中随机取出50尾凡纳滨对虾, 测定其体质量, 并记录(M_0)。饲喂实验结束后, 每组养殖池中随机取50尾, 测定其体质量并记录(M)。通过计算得出每组对虾的体质量增加率:

$$\text{体质量增加率(WGR, \%)} = (M - M_0) / M_0 \times 100$$

攻毒后凡纳滨对虾累计死亡率 饲喂实验结束后, 每组取90尾大小均匀的凡纳滨对虾进行攻毒实验, 将每组对虾随机分为3个平行, 用TSB培养基将副溶血性弧菌进行活化培养并制备发酵液, 使菌液浓度为 $3\sim 6\times 10^7$ CFU/mL, 通过对虾的第二腹节肌肉注射进行攻毒实验, 注射量为 $15\ \mu\text{L}$ ^[8]; 攻毒完成后, 观察对虾存活情况, 记录12、24、36、48、60、72 h对虾的死亡数量, 计算出72 h内的对虾累计死亡率。

肠道微生物的收集 饲喂实验结束后, 每组取60尾凡纳滨对虾完整的肠道, 设置3个平行, 置于预冷的PBS缓冲液中, 充分振荡; 4 °C浸泡 $2\sim 4$ h, $800\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$, 取上清液置于 $50\ \text{mL}$ 无菌离心管中; 用PBS冲洗肠道组织 $3\sim 4$ 次, $800\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$, 合并上清液; 于 $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$, 弃上清液, 沉淀即为收集到的凡纳滨对虾肠道微生物。

肠道微生物基因组提取及测序 肠道微生物基因组提取采用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(DP304-02), 具体操作按说明书进行。提取完成后, 将每组中3个重复的提取产物混为一个样品送北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行16S rDNA V4区测序, 分析不同益生菌饲喂组对虾肠道菌群分布情况。

肠道微生物信息学分析 测序得到的原始数据(raw data)中存在一定比例的干扰数据(dirty data), 为了使信息分析的结果更加准确, 首先对原始数据进行拼接、过滤, 得到有效数据(clean

data)^[9]。然后基于有效数据进行OTUs (operational taxonomic units)聚类, 用Uparse软件(Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)^[10]对所有样品的全部Effective Tags序列聚类, 默认提供以97%的一致性(identity)将序列聚类成为OTUs结果, 利用RDP Classifier (<http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)^[11]与GreenGene数据库(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)^[12]进行物种注释分析, 使用KRONA^[13]对物种注释结果进行可视化展示。并将OTU和物种注释结合, 从而得到每个样品的OTUs和分类谱系的基本分析结果。使用PyN-AST软件(Version 1.2)^[14]与GreenGene数据库中的“Core Set”数据信息^[15]进行快速多序列比对, 得到所有OTUs代表序列的系统发生关系。再对OTUs进行丰度、多样性指数等分析, 同时对物种在各个分类水平上的注释进行群落结构的统计分析。根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前35的属及其在每个样品中的丰度信息绘制热图, 并从分类信息和样品间差异2个层面进行聚类, 便于结果展示和信息发现, 从而找出研究样品中聚集较多的物种或样品。将OTU进行抽样, 获得一致序列后, 作出基于OTU的稀释曲线, 计算Shannon多样性指数^[16]。最后在以上分析的基础上, 进行一系列的基于OTUs、物种组成的聚类分析, PCoA和PCA、CCA和RAD等统计比较分析^[17], 挖掘样品之间的物种组成差异, 并结合不同饲喂菌株进行关联分析^[18]。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾体质量增加率

饲喂实验开始前, 分别对3组对虾池的3个重复组进行随机抽取, 测定50尾对虾的初始体质量, CK组分别为3.62、3.53、3.65 g; Bc组分别为3.64、3.68、3.47 g; Rc组分别为3.48、3.52、3.68 g。饲喂实验结束后再次随机抽取50尾凡纳滨对虾进行体质量的测定, CK组分别为7.02、7.10、7.72 g; Bc组分别为7.82、7.74、7.82 g; Rc组分别为7.34、7.48、7.26 g。Bc组和Rc组对虾体质量均比CK组显著增加($P<0.05$), 其中Bc组对虾的体质量增加率更高($P<0.01$)(图1)。

2.2 对虾累计死亡率

饲喂实验结束后, 为测定益生菌在凡纳滨

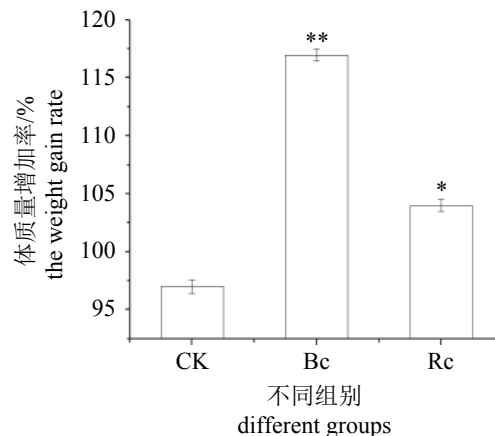


图1 凡纳滨对虾体质量增加率

*. 差异显著($P<0.05$); **. 差异极显著($P<0.01$); 下同

Fig. 1 The weight gain rate of *L. vannamei*

*. significant difference ($P<0.05$); **. highly significant difference ($P<0.01$); the same below

对虾免疫方面的作用, 对经过饲喂的凡纳滨对虾随机取样, 测定其在受到副溶血性弧菌感染72 h内的累计死亡率, 经计算CK组分别为20%、40%、52%、60%、64%、66%; Bc组分别为8%、18%、26%、30%、33%、34%; Rc组分别为10%、20%、28%、32%、36%、38%。饲喂益生菌后, 凡纳滨对虾累计死亡率都有所降低, 其中Bc组累计死亡率最低(图2), 可见饲喂蜡样芽孢杆菌对提高凡纳滨对虾抗病能力的效果较佳。

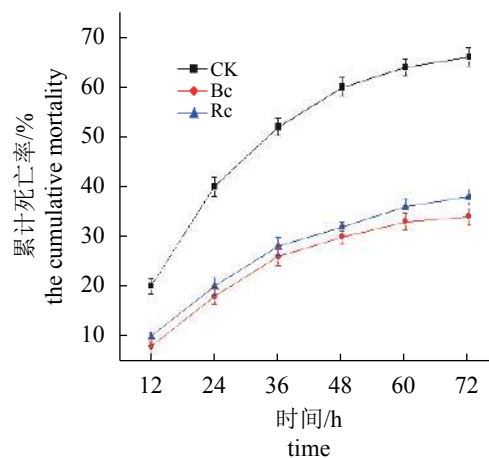


图2 凡纳滨对虾累计死亡率

Fig. 2 The cumulative mortality of *L. vannamei*

2.3 OTU分析及物种注释

OTU聚类分析 对测序原始数据进行处理

后，在97%相似性水平上生成OTU序列，3组样品总序列均值为41 217，无未识别序列出现，各样

品OTU数量范围为374~506，CK组OTU数量最少(图3)，表明饲喂益生菌的2组有效序列相对较多。

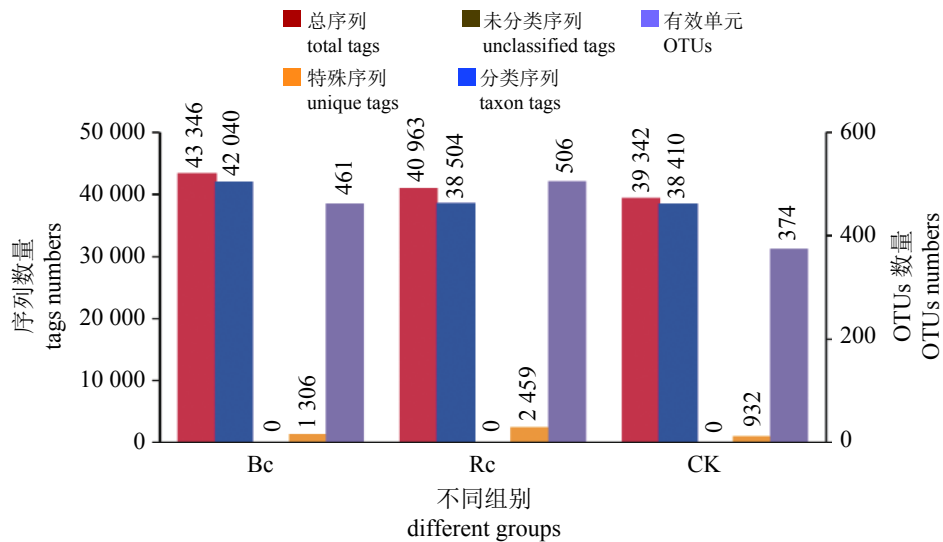


图 3 不同样品的Tags和OTUs数目统计

Fig. 3 The statistical results of Tags and OTUs of different samples

物种注释 将这些具有代表性的序列整体集合，并进行物种注释分析，研究OTUs之间的系统发生关系。并根据物种注释，统计每个样品在各分类水平(界、门、纲、目、科、属、种)上的序列数目，根据物种注释结果，选取在门(Phylum)分类水平上最大相对丰度排名前十的门进行分析。3组对虾肠道中，变形菌门数量最

多，Bc组和Rc组物种丰富度相对较高。Bc组中微生物主要有变形菌门、拟杆菌门、无壁细菌门、厚壁细菌门和假单胞菌。Rc组中微生物主要是变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、酸杆菌门、放线细菌、梭杆菌门和蓝细菌。而CK组中微生物种类较为单一，变形菌门约占95%，还有拟杆菌门(图4)。

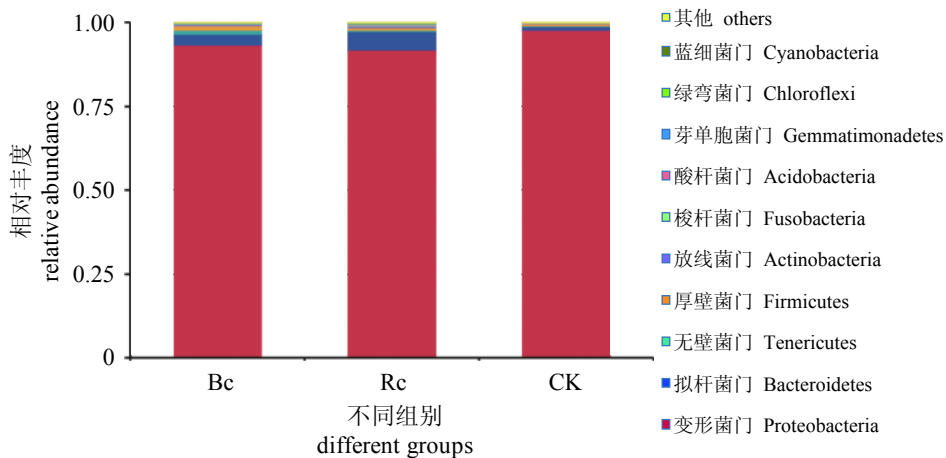


图 4 门水平上的物种相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of species at the phylum level

物种丰度聚类 根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息，选取丰度排名前35的属及

其在每个样品中的丰度信息绘制热图^[19]，并从分类信息和样品间差异2个层面进行聚类，便于结

果展示和信息发现。CK组中微生物比例较大的是片球菌和弧菌, 饲喂益生菌的2组对虾肠道

中, 弧菌比例均较少(图5), 进一步印证了对OTU 聚类结果的分析。

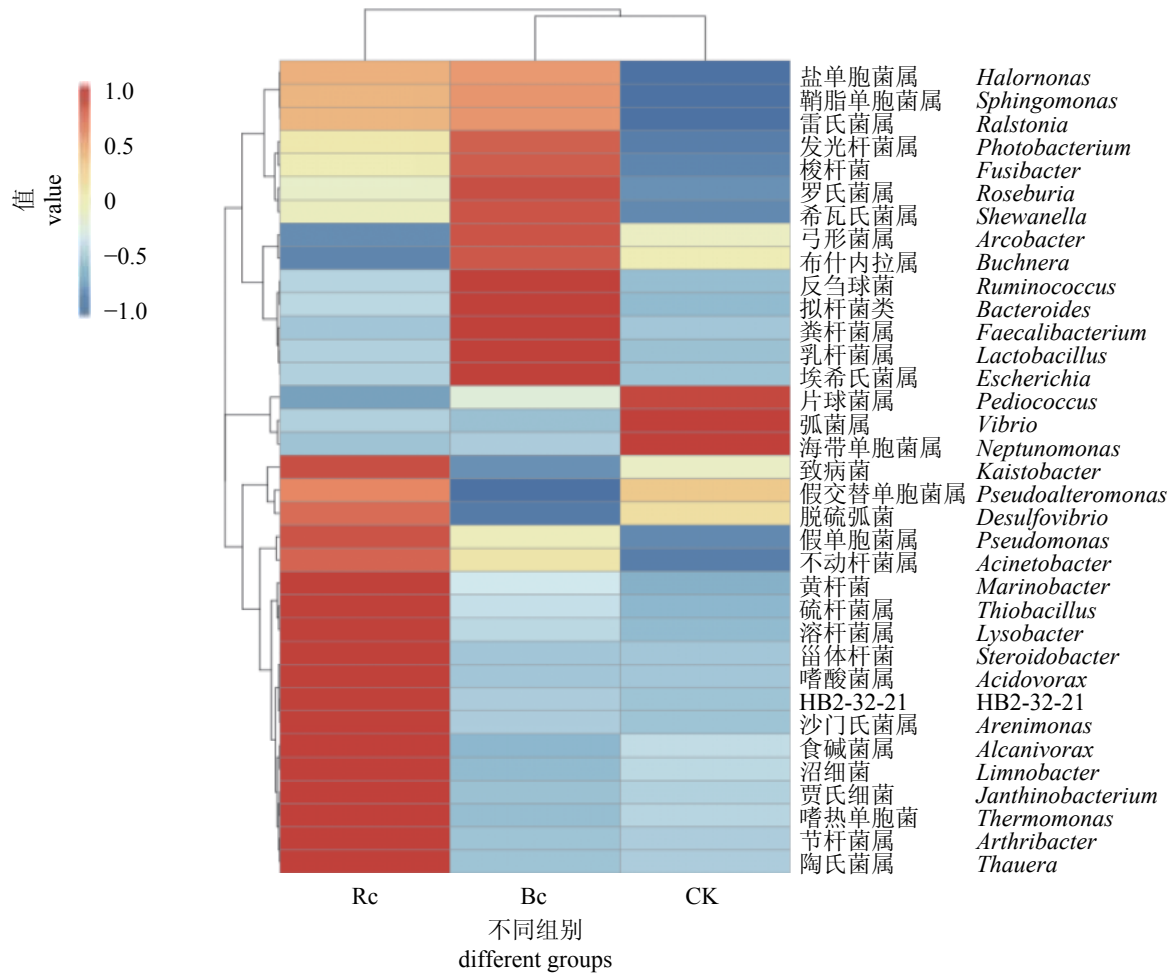


图 5 物种丰度聚类图

Fig. 5 Species richness clustering map

选取最大相对丰度排名前10的属所对应的 OTUs的系统发生关系数据, 以及它们对应的 OTUs的相对丰度信息, 实现OTUs水平上的样品聚类(纵向聚类), 以此考察不同样品间的相似性或差异性, Rc组和CK组对虾肠道微生物物种组成程度较为接近, Bc组相对差异较大(图6)。

2.4 样品复杂度

稀释曲线 所有样本测序覆盖率均在 90%以上, 说明测序对样本中细菌的覆盖率高、测序深度合理, 满足样品中细菌多样性分析的需要。当样品测序数量超过20 000时, 曲线趋向饱和(图7), 说明测序数据量渐进合理, 更多的数据量只会产生少量新的OTUs, 另一方面也说

明随着测序量增加, 无新菌系被发现, 微生物多样性也无明显变化, 表明此次菌群分析结果充分合理。

Shannon指数 在Shannon曲线中, 曲线趋向平坦时(图8), 说明测序数据量足够大^[20], 可以反映样品中绝大多数的微生物信息, 再次证实了稀释曲线最终趋于饱和的合理性。

2.5 多样品比较

PCA分析 样品的群落组成越相似, 它们在PCA图中的距离越接近。Bc组和Rc组对虾肠道微生物群落组成在PC1上相差较大(图9); 与Rc组相比, Bc组在PC2上与CK组的微生物群落组成相似度较远。

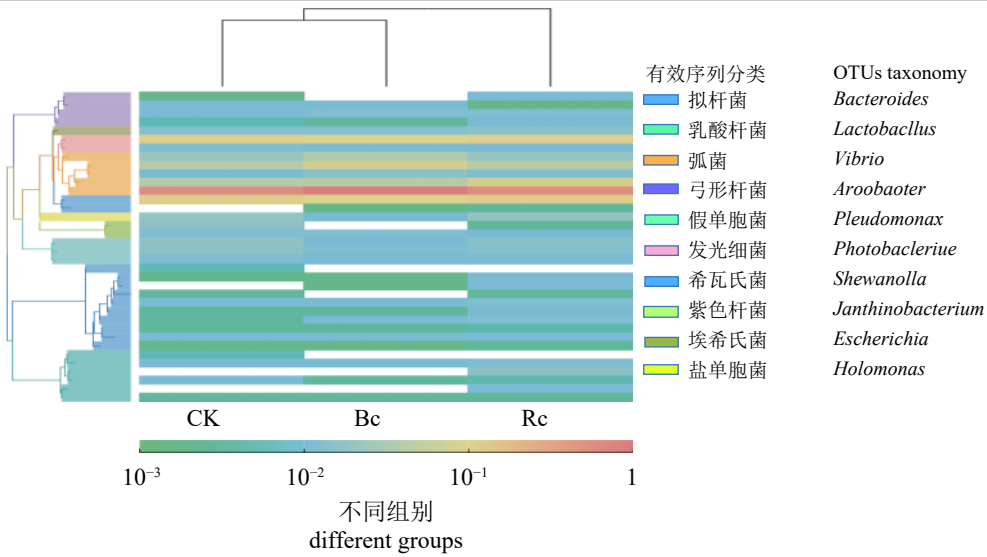


图 6 OTUs丰度聚类图

Fig. 6 OTUs abundance clustering map

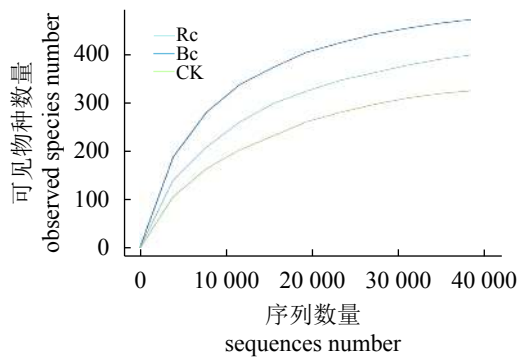


图 7 稀释曲线

Fig. 7 Rarefaction Curve

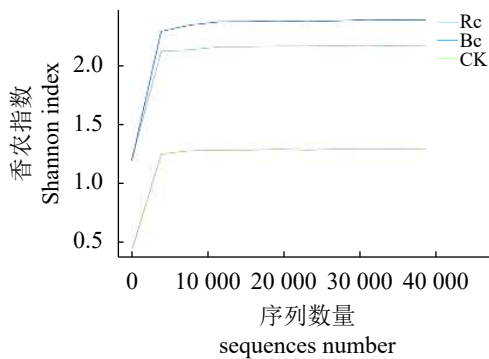


图 8 Shannon 指数曲线

Fig. 8 Shannon exponential curve

样品聚类分析 以Weighted Unifrac距离^[21]矩阵做UPGMA聚类分析,并将聚类结果与各样品在门水平上的物种相对丰度整合。可见,Rc组与CK组物种相对丰度整合结果相近,Bc组整合结果相对较远(图10)。

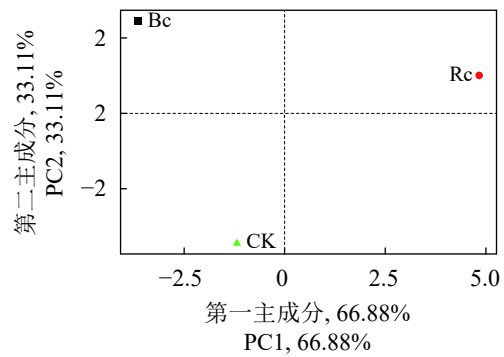


图 9 基于门水平的PCA分析结果

Fig. 9 The results of PCA analysis at the phylum level

3 讨论

目前益生菌已在水产动物养殖业中广泛使用,但其菌种大多为非土著来源菌株,特别是陆源性的芽孢杆菌和光合细菌等菌株应用较多^[22],非土著来源菌株在水产养殖应用上的弊端也日益突出,一方面,这些非土著益生菌在水产动物肠道中难以稳定存在并持续发挥作用^[23];另一方面,投喂此类益生菌有可能会对水体及水产动物肠道原有微生物菌群产生干扰,扰乱其原有菌群结构,从而影响微生态环境。王雯雯^[24]提出能否成功定殖在鱼肠道是考查益生菌能否应用的重要特征之一,并得出具有强定殖能力的益生菌可以显著提高淡水鱼的免疫保护效应的结论;林亮^[25]发现芽孢杆菌制剂可以明显改变虾池表层沉积物细菌类群的组成,通过控制或减

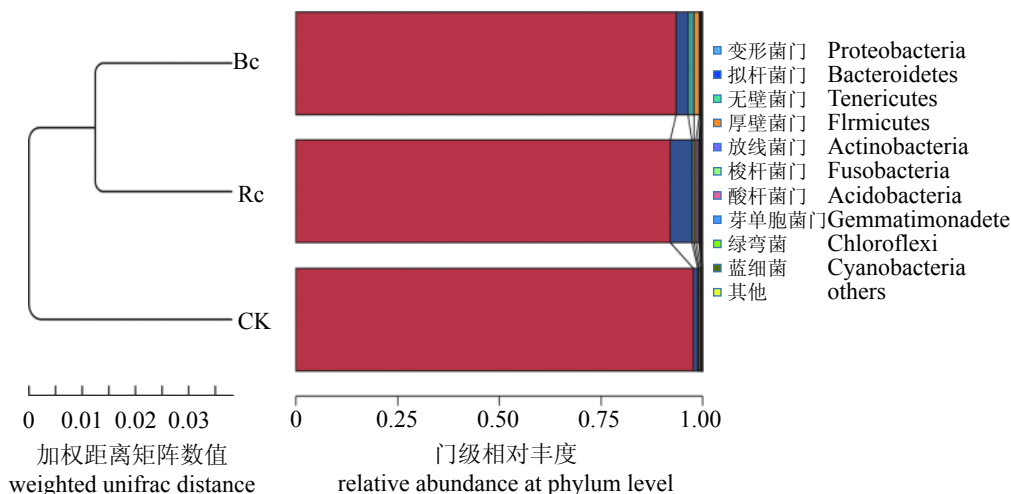


图 10 基于Weighted Unifrac距离的UPGMA聚类树

Fig. 10 UPGMA clustering tree based on Weighted Unifrac distance

少弧菌和发光细菌等有害菌数量, 促进黄杆菌属等有益菌群的生长来影响微生态环境, 从而保持微生物群落的稳定。

为此本研究使用实验室前期从健康凡纳滨对虾肠道中经过抑菌拮抗实验、消化酶实验和安全性实验等筛选出的兼具外泌抑菌活性物质及产消化酶活性物质的优势益生菌, 即蜡样芽孢杆菌和荚膜红细菌2株益生菌^[1], 其有望克服非土著菌群不稳定定殖和干扰原有微生态菌群秩序的两大弊端。本实验是以一定的配比将不同益生菌拌入饲料饲喂凡纳滨对虾30 d后, 提取对虾肠道全基因组DNA, 利用高通量测序对其16S rDNA V4区进行测序, 并结合宏观指标来分析饲喂不同益生菌后对虾肠道的微生物菌群特征。结果显示, 饲喂益生菌可以在一定程度上提高对虾体质量增长率并降低对虾死亡率, 该结果与益生菌可以通过产生消化酶显著提高养殖水产动物对饲料的利用率, 进而促进水产动物生长的益生作用机理相吻合; 弧菌属包括80多种细菌, 其中霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌为水产养殖动物中常见病原菌, 饲喂荚膜红细菌和蜡样芽孢杆菌可以显著提高对虾肠道微生物菌群的丰富度, 并能抑制弧菌属等有害菌群的生长, 表明益生菌在促进对虾肠道微生物菌群多样性方面具有一定的作用。从而得出饲喂益生菌可以在一定程度上抑制病原菌对宿主的感染, 达到提高水产动物抗病能力的作用。这一结论与饲喂益生菌后, 对凡纳滨对虾进行攻毒后的累计死亡率明显降低相吻合, 进

一步证明了益生菌的益生性能之一表现在对水产致病菌的拮抗作用上。

结合本实验的宏观和微观结果, 相较于荚膜红细菌, 蜡样芽孢杆菌菌株对凡纳滨对虾肠道菌群微生物的影响更大, 且宏观益生效果更佳, 这可能与蜡样芽孢杆菌具有外泌抑菌活性物质的作用机制相关, 其在凡纳滨对虾肠道中分泌的抑菌物质抑制了其他微生物, 特别是有害微生物的生长, 从而提高了对虾的抗病能力, 这与实验后期饲喂益生菌蜡样芽孢杆菌组对虾累计死亡率较低的结果具有一致性。唐杨等^[26]通过在饲料中添加芽孢杆菌, 对凡纳滨对虾进行饲喂实验, 发现芽孢杆菌能够促使凡纳滨对虾肠道微生物更加稳定, 可以显著降低凡纳滨对虾肠道内弧菌属的含量, 并显著提高凡纳滨对虾肠道内异养硝化菌属的含量。荚膜红细菌作为一种不产氧光合细菌, 其代谢方式灵活, 可营光能自养和异养、化能自养和异养生长, 具有协同固氮作用^[27], 目前在水产养殖中应用较少, 其具体作用机理仍有待研究。

温崇庆等^[28]提出高通量测序分析对虾肠道菌群结构因DNA提取方法不同而呈现显著差异, 但其优势门一致, 均包括变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和蓝细菌门, 这与本实验测序结论也相一致。樊英等^[29]通过高通量测序揭示不同养殖系统中微生物菌群的差异以及多样性, 对于凡纳滨对虾实际养殖具有指导作用, 对阐述养殖过程中微生物和相关疾病的关系具有重要意义。本实验分别从宏观上的体

质量增长率和攻毒后累计死亡率两个指标以及微观上的对饲喂益生菌后凡纳滨对虾肠道微生物的生物信息学分析等方面探讨了饲喂益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群微生物的影响,为揭示益生菌对水产动物的作用机理提供了参考。

参考文献:

- [1] 窦春萌,左志晗,刘逸尘,等.凡纳滨对虾肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选[J].水产学报,2016,40(4):537-546.
Dou C M, Zuo Z H, Liu Y H, *et al.* Isolation and screening of digestive enzyme producing probiotics from intestine of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(4): 537-546(in Chinese).
- [2] 王晓琳.两株潜在益生菌安全性评价及其对凡纳滨对虾生长、免疫相关酶活力、抗WSSV能力的影响[D].青岛:中国海洋大学,2015.
Wang X L. The safety evaluation of two potential strains of probiotics and their effects on the growth, immune-related enzyme activities, and the ability of anti-WSSV of *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015(in Chinese).
- [3] 李桂英,宋晓玲,孙艳.饲料中益生菌对凡纳滨对虾部分免疫酶活的影响[C]//2010年中国水产学会学术年会论文摘要集.西安:中国水产学会,2011.
Li G Y, Song X L, Sun Y. Effects of probiotics in feed on the activity of partial immune enzymes of *Penaeus vannamei*[C]//Abstract of papers of the 2010 Annual meeting of the Chinese Fisheries Society. Xi'an: China Fisheries Society, 2011(in Chinese).
- [4] 丁啸.基于序列特征的宏基因组数据分析方法研究[D].南京:东南大学,2016.
Ding X. Researches on the sequence-feature-based metagenomic data analysis methods[D]. Nanjing: Southeast University, 2016(in Chinese).
- [5] Di Bella J M, Bao Y G, Gloor G B, *et al.* High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(3): 401-414.
- [6] 陈琼,李贵阳,罗坤,等.凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)亲虾繁殖期水体微生物多样性[J].海洋与湖沼,2017,48(1):130-138.
Chen Q, Li G Y, Luo K, *et al.* Microbial Diversity in broodstock waters of the two genders of *Litopenaeus vannamei*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2017, 48(1): 130-138(in Chinese).
- [7] 沈辉,万夕和,何培民,等.脊尾白虾肠道微生物菌群结构[J].微生物学通报,2015,42(10):1922-1928.
Shen H, Wan X H, He P M, *et al.* Bacterial community structure in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* holehuis[J]. Microbiology, 2015, 42(10): 1922-1928(in Chinese).
- [8] Liu H Y, Li Z, Tan B P, *et al.* Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 300-307.
- [9] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.
- [10] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [11] Wang Q, 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] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* GreenGenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [13] Ondov B D, Bergman N H, Phillippy A M, *et al.* Interactive metagenomic visualization in a Web browser[J]. BMC bioinformatics, 2011, 12(1): 385.
- [14] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, *et al.* PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. Bioinformatics, 2010, 26(2): 266-267.
- [15] DeSantis Jr T Z, Hugenholtz P, Keller K, *et al.* NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): W394.
- [16] Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability[J]. Biometrics, 1987, 43(4): 783-791.
- [17] Avershina E, Frisli T, Rudi K. De novo Semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data[J].

- Microbes and Environments, 2013, 28(2): 211-216.
- [18] Haas B J, Gevers D, Earl A M, *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.
- [19] Li B, Zhang X X, Guo F, *et al.* Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. Water Research, 2013, 47(13): 4207-4216.
- [20] Lozupone C, Lladser M E, Knights D, *et al.* UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison[J]. The ISME Journal, 2011, 5(2): 169-172.
- [21] Lozupone C A, Hamady M, Kelley S T, *et al.* Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1576-1585.
- [22] 孟霄鹏, 孟阳, 王悦, 等. 益生菌对凡纳滨对虾免疫功能及肠道菌群的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(1): 60-65.
Meng X P, Meng Y, Wang Y, *et al.* Effects of probiotics on immunologic functions and intestinal microflora in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(1): 60-65(in Chinese).
- [23] 薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 等. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 785-794.
Xue M, He Y Y, Qiu M D, *et al.* Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 785-794(in Chinese).
- [24] 王雯雯. 鱼类肠道可定植乳酸杆菌分子生态的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
Wang W W. Molecular Ecology of *Lactobacillus* spp. in the gastrointestinal of fish[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011(in Chinese).
- [25] 林亮. 芽孢杆菌制剂对虾池微生物群落以及对虾肠道菌群的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2005.
Lin L. The effect of bacillus probiotics on microbial communities and shrimp intestinal microflora[D]. Guangzhou: Jinan University, 2005(in Chinese).
- [26] 唐杨, 刘文亮, 宋晓玲, 等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 766-774.
Tang Y, Liu W L, Song X L, *et al.* Effects of dietary with *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 766-774(in Chinese).
- [27] 朱美珍, 吴永强. 荚膜红细菌的分离鉴定及其协同固氮作用[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 342-344.
Zhu M Z, Wu Y Q. Studies on the isolation and identification of *Rhodobacter capsulatus* and the acceleration of its nitrogen fixation[J]. Microbiology, 1999, 26(5): 342-344(in Chinese).
- [28] 温崇庆, 何瑶瑶, 薛明, 等. 高通量测序分析DNA提取引起的对虾肠道菌群结构偏差[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 130-142.
Wen C Q, He Y Y, Xue M, *et al.* Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 130-142(in Chinese).
- [29] 樊英, 王晓璐, 李乐, 等. 基于高通量测序的不同养殖系统下凡纳滨对虾肠道和水中微生物的多样性[J]. 广西科学院学报, 2017, 33(4): 261-267, 273.
Fan Y, Wang X L, Li L, *et al.* Analysis of aquaculture-water and gut from *Fenneropenaeus chinensis* in different systems on bacterial diversity based on high-throughput sequencing technology[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2017, 33(4): 261-267, 273(in Chinese).

Analysis of the characteristics of *Litopenaeus vannamei* intestinal microflora after being fed with two probiotics using high-throughput sequencing method

SHANG Bijiao, ZUO Zhihan*, DOU Chunmeng, LI Wenyue, SUN Jinsheng*

(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance,
College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: In order to analyze the effect of *Rhodobacter capsulatus* and *Bacillus cereus* on the intestinal microorganism of *Litopenaeus vannamei*, the experiment was carried out for 30 days in order to study the effect of two probiotics on the culture and feeding of *L. vannamei*. The 16s rDNA V4 region of intestinal microorganism of *L. vannamei* was sequenced with high throughput in the later stage of feeding to analyze the structural characteristics of intestinal microflora of *L. vannamei* fed with different probiotics, and combined with the macroscopical indexes of the growth rate of body mass and the cumulative mortality of the prawn after poisoning. The results: the range of OTU was 374 ~ 506, in which the number of OTU in intestinal tract of the prawn was the lowest in blank group, and the number of OTU in intestinal tract of shrimp was relatively high in two groups after feeding probiotics; at the level of phylum classification, the number of Proteobacteria was the highest in three groups, the CK group was mainly Proteobacteria and a small amount of Bacteroidetes, the Bc group was mainly Proteobacteria, Bacteroidetes, Tenericutes, Firmicutes and Gemmatimonadetes, the Rc group was mainly Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria and Cyanobacteria; the results of rarefaction curve and Shannon index showed that the species abundance and complexity of blank samples were the lowest, and the sample abundance and complexity of *B.cereus* group were relatively high; PCA analysis showed that the microbial composition of the samples of *R. capsulatus* group and blank group was close. Combined with the results of macroscopical growth rate of shrimp body mass and cumulative mortality after poisoning, it can be seen that the effect of *B. cereus* on intestinal microflora of *L. vannamei* is more significant than that of *R. capsulatus*, and the probiotic effect is better. The results showed that feeding probiotics could augment the abundance of intestinal microflora of *L. vannamei*, inhibit the growth of harmful bacteria such as *Vibrio*, increase the growth rate of body mass and reduce the mortality of prawn, so as to achieve the probiotic effect. The effect of feeding *B. cereus* was better than that of *R. capsulatus*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Rhodobacter capsulatus*; *Bacillus cereus*; high throughput sequencing; intestinal bacterial community

Corresponding author: ZUO Zhihan. E-mail: zhihanzuo@163.com; E-mailjinshsun@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472299); Natural Science Foundation of Tianjin (15JCZDJC33800); Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship (ITTFRS2017007); Program for Innovative Research Team in University of Tianjin (TD13-5076); National Key Technology R & D Program of China (2012AA092205, 2012AA10A401); National Basic Research Program of China (2012CB114405)