



## 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

叶海斌<sup>#</sup>, 樊英<sup>\*\*</sup>, 王晓璐, 李乐, 盖春蕾, 刘洪军, 李天保

山东省海洋生物研究院, 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东 青岛 266104

**摘要:**【目的】在循环养殖系统中应用不同的复合益生菌制剂, 探讨凡纳滨对虾肠道菌群结构特征及免疫水平发生的变化。【方法】30 d 养殖周期结束后, 通过平板计数法分析肠道细菌总数和弧菌总数; 基于高通量测序技术分析肠道样品 V3+V4 区菌群特征; 采用实时荧光定量 PCR 技术分析免疫相关因子 TLR1 和 *Dorsal* 基因表达水平, 阐述益生菌制剂应用的意义。【结果】益生菌制剂的应用降低了凡纳滨对虾肠道中细菌总数, 抑制弧菌的生长, 间接预防疾病的发生。不同益生菌制剂从不同程度上优化了凡纳滨对虾肠道菌群结构, 提高高质量序列和有效 OTU 数量, Chao1、Simpson、Shannon 指数显示了丰富度和多样性变化, 复合益生菌制剂 3 效果较好。同时, 菌群结构得到优化, 其中益生菌制剂 1 组对拟杆菌门含量百分比产生显著影响。Toll 受体 TLR1 和 Toll 通路中的 *Dorsal* 基因 mRNA 表达受到益生菌制剂的影响, 1、3 组促进了 TLR 1 表达, 1、2、3 组都促进了 *Dorsal* 基因表达。【结论】在循环水养殖系统中添加益生菌制剂可优化凡纳滨对虾肠道菌群特征, 提高免疫水平, 为病害防控和健康养殖提供理论依据。

**关键词:** 凡纳滨对虾, 肠道微生物, 益生菌制剂, 高通量测序

多种多样的微生物在宿主体、环境中发挥着不容忽视的作用, 参与生命过程和生态系统的发展。肠道微生物作为生命系统中的一部分, 菌群结构和功能参与养殖动物营养代谢、能量平衡、免疫防御, 是维持健康生长及稳定环境的主要因素。外源微生物的干预可能通过影响肠道微生物数量、组成及分布来维持养殖动物及养殖系统的

动态平衡。郑晓婷等<sup>[1]</sup>研究发现, 饲料中添加 0.5% 植物乳酸杆菌能促进对虾肠上皮细胞的高度和微绒毛密度, 增强肠道对营养物质的吸收, 有助于促进对虾消化酶活性, 增强机体对蛋白质、淀粉等营养物质的消化分解, 促进对虾生长。王越新等<sup>[2]</sup>研究发现, 南美白对虾养殖中使用光合细菌和芽孢杆菌, 可使有益菌大量繁殖, 争夺有限的营

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资助资金(CARS-47); 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类产业创新团队(SDAIT-13)

\*通信作者。Tel: +86-532-82688544; Fax: +86-532-82675569; E-mail: fy\_fy123@126.com

<sup>#</sup>并列第一作者。

收稿日期: 2017-12-18; 修回日期: 2018-03-16; 网络出版日期: 2018-06-02

养空间, 限制有害微生物的生长, 同时防止水质恶化, 优化水环境, 从而达到预防疾病的效果。早在 2000 年, Rengpipat 等<sup>[3]</sup>发现, 黑虎虾养殖过程投喂芽孢杆菌 S11 可明显提高抗病毒能力, 实验组黑虎虾的存活率、吞噬细胞活性和抗菌活性均高于对照组。Gullian 等<sup>[4]</sup>研究表明, 芽孢杆菌 P64、弧菌 P62 和溶藻胶弧菌均可显著促进对虾的增长速度。本文研究循环养殖系统中添加益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道微生物及免疫水平的影响, 探讨益生菌制剂的作用效果, 揭示凡纳滨对虾肠道微生物的特征及重要性, 为病害防控和生态养殖提供参考。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾(White Prawn), 分类学上隶属于节肢动物门(Phylum Arthropoda)、甲壳纲(Class Crustacea)、十足目(Order Decapoda)、对虾科(Family Penaeidae)、对虾属(Genus *Penaeus*), 是当前世界上养殖产量最高的三大优良品种之一。养殖条件下, 凡纳滨对虾白天一般都静伏池底, 入暮后则活动频繁, 具有生长快、抗病能力强、经济效益显著等特点。然而, 水环境是凡纳滨对虾养殖过程中的重要保障因素, 影响着养殖动物的生长、生存; 水环境调控则是健康养殖的重要技术环节, 循环水养殖系统因其优化的特征在水产养殖中建立了合理的应用模式<sup>[5-6]</sup>。循环水养殖系统已对欧洲龙虾(*Homarus gammarus* L.)<sup>[7]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[8]</sup>养殖产生了明显的优势效果。本研究中的循环水养殖系统与传统养殖模式相比, 节约用水、减少污染、高密养殖、调控生态环境, 符合健康养殖的要求, 降低疾病发生的风险, 在此基础上探讨不同益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道微生物菌群产生的影响, 以期分析微生物菌群在应用过程中的变化与作用机理, 为健康养殖提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及养殖条件

健康、规格整齐的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)来自山东潍坊某养殖场, 体长约(3.2±0.5) cm, 体重约(3.0±0.5) g, 随机放入养殖池内 500 尾/m<sup>2</sup>。益生菌制剂 1 来自青岛绿海洋生物技术有限公司, 益生菌制剂 2 来自博尚生化科技实业有限公司, 益生菌制剂 3 来自青岛根源生物技术集团有限公司。

试验水源为地下水, 水温(25±1) °C, pH 为 7.2–7.8, 24 h 充气, 溶氧为 5.5–6.5 mg/L, 氨氮小于 0.4 mg/L。循环水养殖模式: 养殖池面积 25 m<sup>2</sup>, 水深 1 m, 养殖水源为地下水曝气消毒后经调温直接流入养殖池中, 养殖废水流入沉淀池, 经沉淀后流入过滤池, 由微滤系统去除残饵、粪便等固体代谢物后, 进入生物滤池(内含大孔生物载体, 在表面及内部固定硝化细菌等微生物), 结合生物膜反应器对废水中氨氮、亚硝酸盐、微生物菌群等进行调节后再流入养殖池内循环使用, 每日添加 10%新水作为补充(循环养殖系统为自行设计)。

试验过程中正常管理, 每天分别于 6:00、14:00、22:00 饱食投喂, 投饵量以投饵后 2 h 内吃完为佳。试验所用基础饲料为大乐饲料有限公司对虾专用配合饲料, 主要营养成分如表 1。

表 1. 基础饲料成分记录分析

Table 1. Proximate analysis of basal diet

Nutrient ingredients	Mass fraction/%	Nutrient ingredients	Mass fraction/%
Crude protein	≥44.0	Calcium	≤5.0
Crude fat	≥4.0	Total phosphorus	≥1.2
Crude fiber	≤6.0	Lysine	≥2.2
Crude ash	≤16.0	Moisture	≤11.0

## 1.2 试验设计

试验共设 3 组, 对照组、试验组 1 (添加益生菌制剂 1, 包括枯草芽孢杆菌+产脲假丝酵母+硝化细菌+光合细菌), 试验组 2 (添加益生菌制剂 2, 包括蛋白分解酵素+乳酸菌+枯草芽孢杆菌+黄链球菌), 试验组 3 (添加益生菌制剂 3, 包括蛋白酶+酵母菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳杆菌), 每组 3 个平行。益生菌制剂添加量为 5 mg/kg, 含活菌数分别达  $10^9$  CFU。养殖周期为 30 d。

## 1.3 试验取样

试验 30 d 后分别从不同试验组中随机取样, 每池选取 5 点位置(四角和中间), 凡纳滨对虾每点取 10 尾, 冰上无菌条件下获取肠道, 用无菌生理盐水冲洗 3 次, 然后将肠道剪开, 获取内容物, 混合,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用; 同时将剩下的肠道组织放入离心管中, 用组织匀浆机处理后混合,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.4 试验流程、分析

称取 0.1 g 肠道内容物, 加入 10 倍体积( $V/W$ ) 无菌预冷重蒸水, 在冰浴中( $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )充分均匀, 以 10 倍递增稀释法进行稀释, 取 3 个合适的稀释度涂布于 2216e、TCBS 培养基(北京陆桥技术股份有限公司), 每个稀释度做 3 个平行,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 1-2 d。

利用 QUAGEN 试剂盒提取肠道内容物基因组总 DNA, 扩增高可变区(引物 319F、806R) (参考陈冠周等<sup>[9]</sup>的方法); 产物纯化之后进行序列测定。测序平台为杭州联川生物技术股份有限公司 Illumina MiSeq 2 × 300 bp paired-end。数据分析流程包括: (1) 数据优化及序列统计。测序获得的原始数据去除 reads 的 barcode 和接头序列, 将每一对 paired-end reads 拼接合并成一条更长的 tag, 去

除含有 N (N 表示无法确定碱基信息)的比例大于 5%的 tags, 去除低质量 tags (质量值  $Q<10$  的碱基数占整个 tag 的 20%以上), 从而获得 Clean 数据。(2) OTU (operational taxonomy unit) 统计分析。采用 CD-HIT 将序列相似性大于 97%的 clean tags 定为一个 OTU, 选择其中序列最长的 reads 作为该 OTU 的代表序列, 统计多组样品中所共有和独有的 OTU 数目, 发现样品之间组成相似性及特异性。(3) 丰度及 Alpha 多样性。包括 Shannon、simpson、chao1 指数, 且从门和目的水平上对不同菌群分布的均匀度进行统计。

不同试验组将部分肠道组织样品混合, 通过大连宝生物工程有限公司 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取总 RNA, 并通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测条带。然后进行反转录, 按照大连宝生物工程有限公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 方法进行。Toll 受体 TLR1<sup>[10]</sup>和免疫相关转录因子 *Dorsal*<sup>[11]</sup>基因表达通过大连宝生物工程有限公司实时荧光定量 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒方法进行测定, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  的方法计算基因相对表达量的变化。实验中所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

表 2. 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因与  $\beta$ -actin 参照基因引物序列

Table 2. Primer pairs for Toll receptor, *Dorsal* and  $\beta$ -actin genes

Primers	Sequences (5'→3')
$\beta$ -actin-F	CGCGACCTCACAGACTACCT
$\beta$ -actin-R	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG
Toll receptor-F	TGAGAGATGCCCACTGCCTG
Toll receptor-R	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG
<i>Dorsal</i> F	GATGGAATGATAGAATGGGAAGC
<i>Dorsal</i> R	CACTGGTACTCTGTCTGGTGGTC

## 1.5 统计分析

数据均用(平均值±标准误)进行表示。用 SPSS 17.0 中的单因素变量方差分析(One-Way ANOVA)方法进行统计学分析,用 Duncan 法进行多重比较。显著水平为  $P<0.05$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 凡纳滨对虾肠道细菌总数和弧菌总数

通过 2216e、TCBS 培养基对凡纳滨对虾肠道内容物细菌总数、弧菌数进行统计。如表 3 所示,试验组细菌总数比对照组显著降低,弧菌数量显著降低,说明不同益生菌制剂有效抑制肠道内弧菌生长。其中,益生菌制剂 3 组凡纳滨对虾肠道细菌数量达 7.22 CFU/g,弧菌数量达 5.01 CFU/g ( $P<0.05$ )。

表 3. 益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道细菌总数和弧菌总数的影响

Table 3. Effects of different probiotics on total bacterium counts (TBC) and Vibrios bacterium counts (VBC) in *Penaeus vannamei* intestinal

Groups	Total bacterium counts/(CFU/g)	Vibrios bacterium counts/(CFU/g)
Control	8.01±0.08 <sup>a</sup>	6.51±0.07 <sup>a</sup>
Treatment 1	7.81±0.08 <sup>b</sup>	5.31±0.03 <sup>b</sup>
Treatment 2	7.26±0.11 <sup>c</sup>	6.13±0.09 <sup>b</sup>
Treatment 3	7.22±0.04 <sup>c</sup>	5.01±0.05 <sup>c</sup>

Values in each column without a common superscript are significantly different ( $P<0.05$ ).

### 2.2 凡纳滨对虾肠道内容物高通量测序结果

由表 4 可看出,本研究中肠道样品的测序结果能够真实地反映试验组别中优势细菌的关系和变化。统计获得,各组别获得的高质量序列百分比都在 90%以上,保持在一个相当的水平,相似性大于 97%的 OTU 数量由于益生菌制剂的作用发生了变化,优质有效序列明显增加,序列间相似度提高,益生菌制剂 3 组最明显。对各个样品细菌多样性的相互关系进行分析,并构建 VENN 图(图 1)。应用益生菌制剂后,高质量序列整合发现,OTU 数量是对照组>益生菌制剂 1 组>益生菌制剂 2 组>益生菌制剂 3 组,益生菌制剂 1 组存在 74 个差异 OTU,益生菌制剂 2 组存在 88 个 OTU,而益生菌制剂 3 组存在 65 个差异 OTU。反映样品多样性的 Chao1、Simpson、Shannon 指数值统计结果同样显示,肠道内容物中微生物群落的多样性指数因为益生菌制剂的应用而发生变化,且有进一步的提升。Chao1 指数代表群落丰富度,益生菌制剂 3 提高效果显著;Shannon、Simpson 指数与群落多样性指数呈正比,益生菌制剂 3 组样品微生物群落多样性指数最大。

对不同组别凡纳滨对虾肠道内容物样品中细菌门类进行统计(表 5、图 2)。结果显示,不同组别中的优势菌门类包括变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、放线菌门 Actinobacteria、

表 4. 不同处理组肠道样品的丰富度和多样性统计

Table 4. Richness and diversity indexes of gut microflora in different treatments

Groups	Valid data	High sequences	OTU	Diversity indexes		
				Chao 1	Simpson	Shannon
Control	15618	15508	408	534.91	0.84	5.25
Treatment 1	20777	20562	384	415.96	0.85	4.25
Treatment 2	14977	14805	380	514.14	0.91	5.47
Treatment 3	10901	10776	326	581.34	0.94	5.52

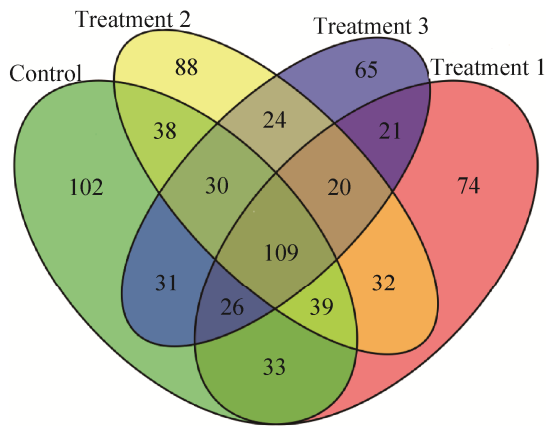


图 1. 各样品中细菌多样性的相关性分析  
Figure 1. Correlation analysis of bacterial diversity in different treatments. Numbers of OTU in different treatments.

表 5. 不同处理组肠道样品细菌门的水平及其相对丰度百分比

Table 5. Frequency and levels of phylum in microbial communities from different samples (%)

Microbial communities	Groups			
	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Proteobacteria	73.6	51.9	78.4	75.0
Bacteroidetes	3.1	40.7	9.1	13.8
Actinobacteria	3.6	5.5	3.2	6.7
Verrucomicrobia	6.1	1.4	1.0	2.6
Firmicutes	1.5	0.2	6.0	0.3
Candidatus	3.5	0.3	0.5	1.1
Saccharibacteria				
Cyanobacteria	7.3	0.0	0.9	0.0

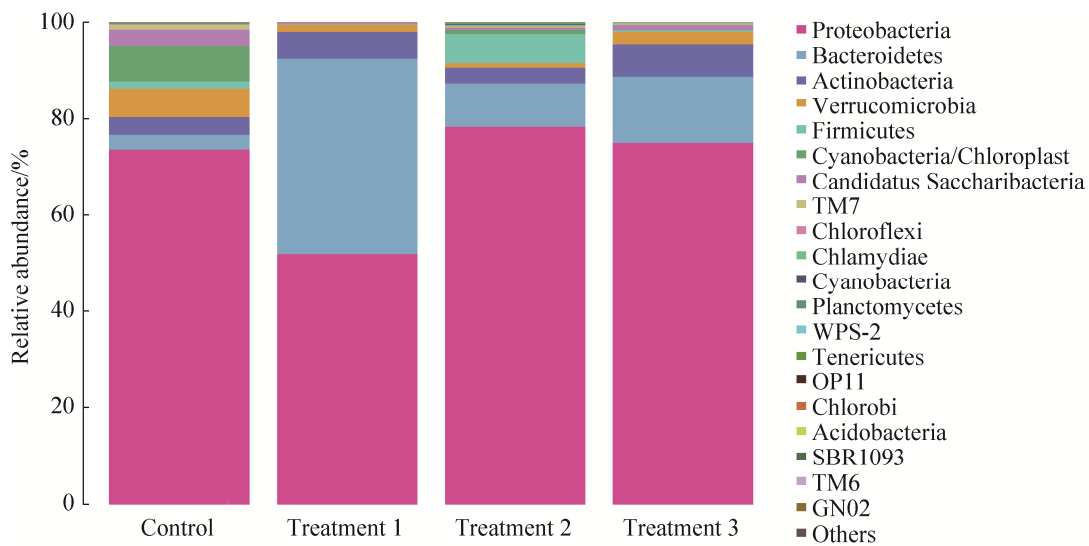


图 2. 不同处理组肠道样品细菌门的水平及其相对丰度百分比  
Figure 2. Frequency and levels of phylum in microbial communities from different samples (%).

疣微菌门 Verrucomicrobia、厚壁菌门 Firmicutes、柔膜菌门植原体暂定种 Candidatus Saccharibacteria、蓝菌门 Cyanobacteria, 其中百分比例最高的是变形菌门, 益生菌制剂 1 组变形菌门比例比对照组低( $P < 0.05$ ), 而益生菌制剂 2 组和 3 组比对照组稍高( $P > 0.05$ ); 与对照组比较, 变化最显著的是拟杆菌门, 对照组仅有 3.1%, 益生菌制剂 1 组达 40.7%,

益生菌制剂 2 组达 9.1%, 益生菌制剂 3 组达 13.8%。

进一步对不同组别样品中优势菌进行目的分析(表 6、图 3), 发现优势菌目主要有红细菌目 Rhodobacterales、黄杆菌目 Flavobacteriaceae、放线菌目 Actinomycetales、蓝菌目叶绿体 Chloroplast、疣微菌目 Verrucomicrobiales、根瘤菌目 Rhizobiales、酸微菌目 Acidimicrobiales、乳杆菌目 Lactobacillales。

表 6. 不同处理组肠道样品细菌目的水平及其相对丰度百分比

Table 6. Frequency and levels of order in microbial communities from different samples (%)

Microbial communities	Groups			
	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Rhodobacterales	64.9	47.4	41.7	69.6
Flavobacteriaceae	2.8	39.7	8.4	12.3
Actinomycetales	1.6	5.2	1.9	5.8
Chloroplast	7.3	0.0	0.9	0.0
Verrucomicrobiales	6.1	1.4	1.0	2.6
Rhizobiales	4.0	0.7	1.7	1.0
Acidimicrobiales	1.7	0.2	1.3	0.9
Lactobacillales	0.9	0.0	4.7	0.1

益生菌制剂 1 组和 2 组降低了凡纳滨对虾肠道样品中红细菌目的比例，益生菌制剂 3 组稍有提高 ( $P>0.05$ )；益生菌制剂 1、2、3 组均提高了样品中拟杆菌目的比例，以益生菌制剂 1 组最为显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 凡纳滨对虾肠道组织免疫基因表达

不同益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道组织 Toll 受体 TLR1 和 *Dorsal* mRNA 表达水平产生了影响 (表 7)。益生菌制剂 1 组和 3 组 TLR1 和 *Dorsal* 表达水平比对照组均有提高 ( $P<0.05$ )；益生菌制剂 3 对 TLR1 和 *Dorsal* mRNA 表达水平影响尤为显著，

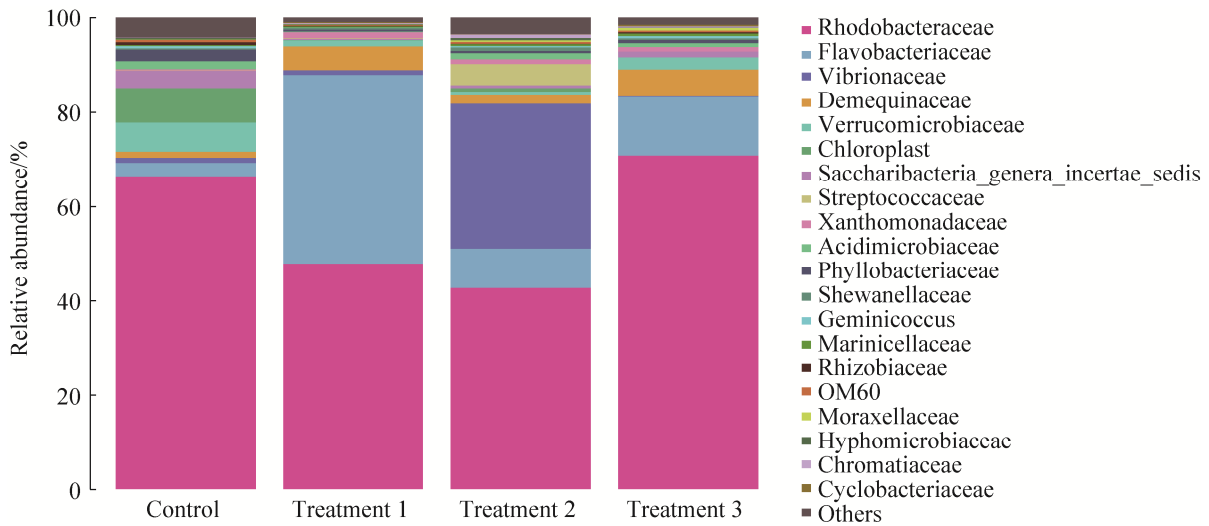


图 3. 不同处理组肠道样品细菌目的水平及其相对丰度百分比

Figure 3. Frequency and levels of order in microbial communities from different samples (%).

表 7. 不同益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道组织中 Toll 受体和 *Dorsal* mRNA 相对表达的影响

Table 7. Toll receptor and *Dorsal* mRNA expression levels in the gut of *L. vannamei* with different treatments

Groups	Toll receptor TLR1	<i>Dorsal</i>
Control	1.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>
Treatment 1	2.2 <sup>b</sup>	3.0 <sup>b</sup>
Treatment 2	1.0 <sup>a</sup>	2.3 <sup>c</sup>
Treatment 3	3.2 <sup>c</sup>	4.7 <sup>d</sup>

Values with a different superscript letter indicate difference at  $P<0.05$ .

TLR1 mRNA 相对表达量为 3.2 ( $P<0.05$ )，比对照组提高了 220%，*Dorsal* mRNA 相对表达量为 4.7 ( $P<0.05$ )，比对照组提高了 370%。

## 3 讨论

### 3.1 复合益生菌制剂对凡纳滨对虾肠道中细菌和弧菌数量的影响

凡纳滨对虾养殖中主要的病害之一即是弧菌

病, 由条件致病菌——弧菌属细菌引起, 其传染性疾病给养殖业带来越来越严重的影响。当养殖条件恶化、生态环境失衡时, 凡纳滨对虾自身以及养殖水环境中弧菌数量发生变化, 在与有益菌竞争过程中引发细菌性疾病的暴发, 最终导致对虾死亡, 降低养殖效益。本研究中, 不同益生菌制剂的使用都降低了循环水养殖系统凡纳滨对虾肠道细菌总数和弧菌总数, 益生菌制剂的有益菌成分在养殖过程中参与了营养物质的竞争, 占据生存繁殖空间, 从而抑制了有害菌的生长, 维持并调控了凡纳滨对虾肠道微生态平衡。胡毅等<sup>[12]</sup>的研究结果也表明, 饲料中添加益生菌能有效降低肠道和粪便中的弧菌数, 优化肠道菌群环境, 促进凡纳滨对虾生长。Vaseeharan 和 Ramasamy<sup>[13]</sup>在研究中论述, 益生菌芽孢杆菌能有效抑制哈维氏弧菌(*V. harveyi*)的生长, 降低了斑节对虾肠道弧菌数量。这些均与本研究结果相似。然而, 2000 年 Rengpipat 等<sup>[3]</sup>在室内研究了益生菌对斑节对虾肠道弧菌影响不显著, 这可能是养殖环境差异造成的, 益生菌的添加效果与养殖动物的生存环境有关, 因此对养殖环境进行有效干预可达到促进效果。本研究即体现了这一优势, 优化养殖环境的基础上添加益生菌制剂的应用, 不同细菌在宿主肠道微生物环境中发挥不同的作用, 维持肠道菌群平衡, 优化菌群结构, 最终达到抑制弧菌等有害菌生长、优化正常细菌总数的效果, 这与 Tannock<sup>[14]</sup>的论述相似。

### 3.2 复合益生菌制剂对循环养殖系统凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响

动物肠道是机体内微生物存在最丰富的场所, 受到环境、药物等外界因素影响时, 肠道菌群发挥作用以维持肠道正常生理功能, 调节机体

免疫以及拮抗病原微生物定殖等。研究表明, 肠道微生物对宿主健康有极其重要的意义, 稳定的肠道生态结构会产生积极的影响, 分析动物肠道中微生物菌群的组成、分布, 可有效预防疾病的发生<sup>[15-16]</sup>。在凡纳滨对虾中也不例外, 肠道微生物菌群结构和功能发挥重要作用, 参与对虾营养代谢、能量平衡、免疫防御等重要生理过程<sup>[17-18]</sup>。随着益生菌制剂在养殖系统中的应用, 它的作用效果得到越来越多的肯定。本研究中体现了不同的益生菌制剂对循环养殖系统凡纳滨对虾肠道菌群结构产生的作用。通过高通量测序技术发现, 应用益生菌制剂后凡纳滨对虾肠道菌群中高质量序列数增加, 益生菌制剂 3 组 OTU 数量发生显著性差异, 肠道内微生物菌群受到外界影响后细菌的定殖、繁殖发生一系列变化, 不同的细菌其影响耐受性不同, 可能益生菌制剂 3 组的益生菌成分更有利于凡纳滨对虾肠道菌群的适用, 机理有待进一步研究。Chao1、Simpson、Shannon 指数反映了不同样品的多样性, 益生菌制剂 3 组多样性指数相对较高, 但 OTU 数量则较低, 这就说明了益生菌制剂 3 对肠道菌群的优化度最好, 抑制了少量微生物的生长, 为优势菌群提供了更多更好的生长空间, 相似度>97%的细菌较多。有研究认为, 益生菌的益生功能不是降低宿主的炎症反应或产生杀菌活性分子, 而是由于特异的粘附因子的存在, 便于益生菌在宿主机体肠道内的定殖<sup>[19]</sup>。本研究结果中, 不同益生菌制剂组分在凡纳滨对虾肠道中的定殖不同, 与肠道固有菌群之间的竞争不同, 最终产生了不同的效果, 达到优化菌群生态环境的目的。

高通量测序技术, 包括变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术都被普遍用来分析微生物多样性。王

亭芳等<sup>[20]</sup>和薛明等<sup>[21]</sup>都分析了凡纳滨对虾养殖水体中的微生物多样性,不同时间的多样性存在相似性,主要以变形菌门和拟杆菌门为主。唐杨等<sup>[22]</sup>通过 DGGE 技术获得,健康凡纳滨对虾肠道中菌群结构主要是变形菌门,其次是拟杆菌门,属的水平则包括异养硝化菌属、弧菌属、*Anaerospira* 和小红卵菌属等。本研究结果表明,循环养殖系统健康凡纳滨对虾肠道中主要包括变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、厚壁菌门等,益生菌制剂的应用提高了变形菌门、拟杆菌门、放线菌门的丰度,降低了疣微菌门、厚壁菌门丰度;目的水平上表现为红细菌目、黄杆菌目、放线菌目、疣微菌目、根瘤菌目等的变化。益生菌制剂 1、2 组明显降低了样品中红细菌目的丰度百分比,益生菌制剂 3 组比对照组稍有提高,这跟不同组别中细菌总数和弧菌总数的结果相呼应,可能由于红细菌具有一定的抑制细菌生长作用,所以益生菌制剂 3 组样品中细菌总数和弧菌总数低。另有研究表明,对虾的肠道内以厚壁菌门、放线菌门、梭杆菌门和变形菌门为主,而拟杆菌门的检出率则比较低<sup>[23-24]</sup>,本实验得出益生菌制剂 1 组中拟杆菌门丰度百分比显著提高,可能因为不同种类的益生菌对宿主的益生作用机理不同、代谢作用不同,益生菌制剂 1 中各组分能有效促进降解纤维素、几丁质、果胶质等不同生物高分子的活性,进而增加拟杆菌门的繁殖和定殖效果。

### 3.3 复合益生菌制剂对循环养殖系统中凡纳滨对虾肠道免疫因子表达的影响

研究表明,凡纳滨对虾在受到有害微生物威胁时,机体借助 PGRP-SA 和 GGBP-1 复合物与病原微生物上病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)结合后激活 Spatzle 蛋白,

被活化的 Spatzle 蛋白与 Toll 受体结合,将异物入侵的信号从胞外传递到胞内,从而引起胞内信号级联反应,释放出类似于 NF- $\kappa$ B 样蛋白的核转录因子,进入细胞核与 DNA 结合,调节抗菌肽基因的表达<sup>[25-27]</sup>。在没有刺激的细胞中,大部分的 NF- $\kappa$ B 二聚体通过与细胞质中 3 个抑制因子(I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ )中的一个结合而以无活性的状态存在。当益生菌制剂介入后,肠道中 I $\kappa$ Bs 首先是在 I $\kappa$ Bs 激酶(IKK)催化下使其 2 个保守的丝氨酸残基磷酸化,接着 I $\kappa$ Bs 在 SCF-E3 泛素化酶复合体的催化作用下多泛素化而被蛋白酶降解,活化的 NF- $\kappa$ B 转位到核内与其相关的 DNA 基序结合以诱导靶基因的转录,提高目的基因表达量,间接提高机体免疫能力。凡纳滨对虾 Toll 受体在血细胞及鳃中表达量高,在肠、肌肉和肝胰脏中也有表达,表达水平在一定程度上可反映机体对外界入侵信号及时传递并产生相应免疫反应的状况<sup>[10]</sup>。因此,本研究中选择机体中重要的非特异性免疫组成部分——Toll 受体(toll-like receptors, TLRs) mRNA 表达水平来反映肠道组织对益生菌制剂应用产生的响应。冯伟等<sup>[28]</sup>报道,Vc 的添加影响着凡纳滨对虾 Toll 受体的表达;郭腾飞等<sup>[10]</sup>报道,不同锌水平的添加也影响着凡纳滨对虾 Toll 受体的表达。本研究中,益生菌制剂 1、3 使 TLR1 表达量提高,益生菌制剂 2 未发生显著变化,表达量与对照组相当。凡纳滨对虾 Toll 受体 mRNA 表达水平发生不同程度的变化,可能由于益生菌制剂的给予干预了机体肠道对外界物质入侵时作出的信号传递,阻止或促进了免疫反应的发生,机制探讨有待进一步研究。

*Dorsal* 基因是 Toll 通路下游的核转录因子<sup>[11]</sup>,属于 Rel/NF- $\kappa$ B 家族,当外界刺激存在的条件下,



抗菌肽基因的转录即发生, 益生菌制剂的给予是否影响 *Dorsal* 基因的表达正是本研究的目的, 间接反映机体的免疫机制。研究发现, 益生菌制剂 3 组凡纳滨对虾肠道中 *Dorsal* 基因表达被显著激活, 比对照组提高了 370%, 诱导效果显著, 这说明益生菌制剂组干扰 Toll 受体蛋白结合、信号传递、转录表达等一系列级联反应, 也可能与肠道结构的变化有关, 仍需进一步探讨。

## 4 结论

本研究中不同益生菌制剂的应用可不同程度地抑制弧菌生长, 优化生态环境。通过 Illumina Miseq 高通量测序技术对 16S rDNA V3+V4 可变区序列进行测序分析, 应用益生菌制剂后肠道微生物高质量序列增多, 有效 OTU 数量得到优化, 不同多样性指数均呈现了良好状态; 优势细菌丰度变化不同, 主要表现在变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、厚壁菌门、Candidatus Saccharibacteria 和蓝菌门; 以及在目的水平上, 红细菌目和黄杆菌目发生了显著的变化, 益生菌制剂 1 最显著。通过实时荧光定量 PCR 分析不同益生菌制剂对肠道组织免疫基因表达影响, TLR1 和 *Dorsal* mRNA 表达量均得到了提高, 益生菌制剂 3 处理组最高。综合说明益生菌制剂达到了优化肠道菌群特征、提高肠道免疫的目的, 且益生菌制剂 3 效果更优。

## 参考文献

[1] Zheng XT, Duan YF, Dong HB, Yang K, Yang YY, Zhang JS. Effects of *Lactobacillus plantarum* on growth performance, gut histology and activity of digestive enzymes in Pacific White Leg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*, 2016, 35(1): 1–6. (in Chinese)  
郑晓婷, 段亚飞, 董宏标, 杨铿, 杨莺莺, 张家松. 植物乳

酸杆菌对凡纳滨对虾生长、消化酶活性和肠道组织形态的影响. *水产科学*, 2016, 35(1): 1–6.

- [2] Wang YX, Wang GX, Zhang W. Application technology of photosynthetic bacteria and *Bacillus* in the aquaculture of White Prawn. *Fisheries of Heilongjiang*, 2008, (2): 22–23. (in Chinese)  
王越新, 王桂香, 张巍. 光合细菌和芽孢杆菌在南美白对虾养殖中的应用技术. *黑龙江水产*, 2008, (2): 22–23.
- [3] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271–288.
- [4] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2004, 233(1/4): 1–14.
- [5] Yuan H, Wang JK. KBMR microalgae shrimp brood stock and clam seeds integrated recirculating production system.//AES Session: Microalgae-based Recirculation Systems Recirculating aquaculture Production Systems. World Aquaculture, Bali, Indonesia, 2005.
- [6] Li CH, Wei XL, Wang XF, Jie XY, Hu WA, Lu QY, Liu L, Xu JJ. Technical characteristics and trend of cultivation pattern under the recycling water in shrimp pond. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 37(24): 105–108. (in Chinese)  
李纯厚, 魏小岚, 王学锋, 颀晓勇, 胡维安, 陆琴燕, 刘璐, 徐娇娇. 池塘循环水对虾养殖模式的技术特点及发展趋势. *广东农业科学*, 2011, 37(24): 105–108.
- [7] Drengstig A, Bergheim A. Commercial land-based farming of European lobster (*Homarus gammarus* L.) in recirculating aquaculture system (RAS) using a single cage approach. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 14–18.
- [8] Tan J, Luo K, Luan S, Cao BX, Guo ZJ, Xu SY, Kong J. Preliminary application of the recirculating aquaculture system in *Litopenaeus Vannamei* breeding. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 6(4): 63–70. (in Chinese)  
谭建, 罗坤, 栾生, 曹宝祥, 郭兆加, 许圣钰, 孔杰. 循环水养殖系统在凡纳滨对虾种虾养殖中的应用效果初探. *中国海洋大学学报*, 2016, 6(4): 63–70.
- [9] Chen GZ, Zhang BL, Ji MM, Wu XG, Zhou JY, Chen JN, Wang Y, Tian H, Zhang XJ. Gut microbiota of polystyrene-eating mealworms analyzed by high-throughput sequencing. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 2011–2018. (in Chinese)  
陈冠舟, 张白鹭, 纪梦梦, 吴晓刚, 周君仪, 陈家楠, 王芸, 田浩, 张晓君. 高通量测序探究嗜食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫的肠道菌群结构. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 2011–2018.
- [10] Guo TF, Huang XX, Su M, Wang WG, Huai XJ, Hu P, Yan JQ, Lv D, Huang ZZ. Effects of zinc supplementation in diet on

- the immunity, *Vibrio*-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1081–1089. (in Chinese)
- 郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 王武刚, 怀向军, 胡盼, 严佳琦, 吕丹, 黄征征. 饲料锌添加水平对凡纳滨对虾免疫抗菌机能和溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响. *水产学报*, 2011, 35(7): 1081–1089.
- [11] Qi CC, Wang BJ, Liu M, Jiang KY, Zhao W, Ren CH, Hu CQ, Wang L. Effects of short term addition of aflatoxin B1(AFB1) on the intestinal mucosal barrier of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1936–1945. (in Chinese)
- 齐灿灿, 王宝杰, 刘梅, 蒋克勇, 赵伟, 任春华, 胡超群, 王雷. 黄曲霉毒素 B1(AFB1) 的短期投喂对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障的影响. *水产学报*, 2017, 41(12): 1936–1945.
- [12] Hu Y, Tan BP, Mai KS, Ai QH, Zheng SX, Cheng KM. Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 244–251. (in Chinese)
- 胡毅, 谭北平, 麦康森, 艾庆辉, 郑石轩, 程开敏. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 244–251.
- [13] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36: 83–87.
- [14] Tannock GW. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, 1998, 8(5/6): 527–533.
- [15] 李玉宏. 养殖对虾肠道微生物区系的特征与功能. 上海海洋大学硕士学位论文, 2013.
- [16] Wang XH, Li HR, Zhang XH, Li Y, Ji WS, Xu HS. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(3): 493–498.
- [17] Li JQ, Tan BP, Mai KS. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 2009, 291(1/2): 35–40.
- [18] Zhou ZG, Ding ZK, Huiyuan LV. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(2): 296–301.
- [19] Rendueles O, Ferrières L, Frétaud M, Bégau E, Herbomel P, Levraud JP, Ghigo JM. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(7): e1002815.
- [20] Wang TF, Jin FJ, Ma SY, Chang ZY, Zhao YL, Gao HL. Research on microbial diversity in aquicultural water of *Penaeus vannamei* with DGGE technique. *Biotechnology Bulletin*, 2012, (10): 131–136. (in Chinese)
- 王亭芳, 金凤杰, 马士禹, 常忠义, 赵云龙, 高红亮. DGGE 技术对南美白对虾养殖水体中微生物多样性的研究. *生物技术通报*, 2012, (10): 131–136.
- [21] Xue M, He YY, Qiu MD, Liang HF, Chen DX, Wang LQ, Liu YF, Wen CQ. Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 785–794. (in Chinese)
- 薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 梁华芳, 陈第省, 王立群, 刘杨锋, 温崇庆. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征. *水产学报*, 2017, 41(5): 785–794.
- [22] Tang Y, Liu WL, Song XL, Zhang XJ, Zhang SJ, Huang J. Effects of dietary with *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 765–774. (in Chinese)
- 唐杨, 刘文亮, 宋晓玲, 张晓静, 张盛静, 黄捷. 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. *水产学报*, 2017, 41(5): 765–774.
- [23] Zhang ML, Sun YH, Chen K, Yu N, Zhou ZG, Chen LQ, Du ZY, Li EC. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 2014, 434: 449–455.
- [24] Rungrasamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Chaiyapechara S, Jiravanichpaisal P, Karoonuthaisiri N. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS One*, 2014, 9(3): e91853.
- [25] Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart JM. Activation of *Drosophila* toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 2002, 297(5578): 114–116.
- [26] Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 2003, 426(6962): 33–38.
- [27] Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(7): 304–311.
- [28] Feng W, Li J, Li JT, Chen P, Liao MJ. Effects of supplemental different level Vc on survival and non-specific immunity of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(2): 200–207. (in Chinese)
- 冯伟, 李健, 李吉涛, 陈萍, 廖梅杰. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF- $\kappa$ B 表达量的影响. *水产学报*, 2011, 35(2): 200–207.

# Effects of three biological agents on intestinal microbiota of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a water-recirculating cultivation system

Haibin Ye<sup>#</sup>, Ying Fan<sup>##\*</sup>, Xiaolu Wang, Le Li, Chunlei Gai, Hongjun Liu, Tianbao Li

Key Laboratory for Disease Control in Mariculture of Shandong Province, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, Shandong Province, China

**Abstract: [Objective]** We studied the effects of three biological agents on intestinal microbiota and immunity of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a water-recirculating cultivation system. **[Methods]** The composition of three biological agents were *Bacillus subtilis*, *Candida utilis*, nitrifying bacteria and photosynthetic bacteria (treatment 1); Proteinase, *Acidophilus* spp., *Bacillus subtilis* and *Faecalis* spp. (treatment 2); and Protease, yeast, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* (treatment 3). After feeding 30 days, the total numbers of bacteria and *Vibrio* in the intestine of *L. vannamei* were calculated using plate counting. The high throughput sequencing of 16S rDNA gene's V3+V4 region was used to determine diversity and composition of bacterial communities. Real time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression levels of Toll-like receptor 1 (TLR1) and *Dorsal*. **[Results]** After the application of biological agents, the total number of bacteria in the intestine of *L. vannamei* was reduced to 7.22 CFU/g, and the growth of *Vibrio* was inhibited (5.01 CFU/g) in treatment 3. In treatment 3, the percentage of high sequences and Operational Taxonomic Unit (OTU) were increased to 98.8% and 326, Chao1, Simpson, Shannon was 581.34, 0.94, 5.52 respectively, which displayed the changes of bacterium abundance and diversity in intestine. Furthermore, the community structure of intestinal microbiota was optimized. Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Candidatus Saccharibacteria and Cyanobacteria were the main dominant phyla. However, the proportion of Bacteroidetes was significantly increased (40.7%) in the treatment 1 ( $P<0.05$ ). The different expression levels of Toll-like receptor 1 and *Dorsal* were changed in different probiotics. In treatment 3, the expression level of Toll-like receptor 1 (TLR1) was 3.2 ( $P<0.05$ ), which was 220% higher than control, meanwhile, the expression level of *Dorsal* was 4.7 ( $P<0.05$ ), which was 370% higher than control. **[Conclusion]** Our study revealed that biological agents played an active role in the recirculating system, which could optimize the structure of intestinal microbiota and improve the expression levels of immune genes. In this case, these biological agents could serve as candidates for diseases prevention and healthy aquaculture. And the treatment 3 was the better.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, intestinal microbiota, biological agents, high throughput sequencing

(本文责编: 李磊)

Supported by the China Agriculture Research System (CARS-47) and by the Shandong Agriculture Industrial Technology (SDAIT-13)

\*Corresponding author. Tel: +86-532-82688544; Fax: +86-532-82675569; E-mail: fy\_fy123@126.com

<sup>#</sup>These authors were contributed equally to this work.

Received: 18 December 2017; Revised: 16 March 2018; Published online: 2 June 2018