



# 凡纳滨对虾繁育系统菌群结构及优势菌遗传多样性分析

唐苗苗<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2,3</sup>, 王春元<sup>2,3</sup>, 张正<sup>2,3</sup>, 廖梅杰<sup>2,3</sup>, 李彬<sup>2,3</sup>, 荣小军<sup>2,3</sup>,  
葛建龙<sup>2,3</sup>, 于永翔<sup>2,3\*</sup>

1 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

唐苗苗, 王印庚, 王春元, 张正, 廖梅杰, 李彬, 荣小军, 葛建龙, 于永翔. 凡纳滨对虾繁育系统菌群结构及优势菌遗传多样性分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3068-3082.

TANG Miaomiao, WANG Yingeng, WANG Chunyuan, ZHANG Zheng, LIAO Meijie, LI Bin, RONG Xiaojun, GE Jianlong, YU Yongxiang. Microbial community structure and genetic diversity of dominant bacteria in *Litopenaeus vannamei* breeding system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3068-3082.

**摘要:** 【目的】探讨凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)工厂化繁育系统内发生细菌性玻化症(shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome, BVS)时期可培养微生物的菌群特征以及优势病原菌的遗传多样性。【方法】采用细菌体外培养方法结合基因测序技术对不同育苗阶段的亲虾、受精卵、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体、仔虾, 及其育苗池水和饵料内可培养细菌菌群的组成与结构特征进行研究, 并通过多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)方法解析病原菌的遗传多样性。【结果】系统内分离纯化的 526 株具有典型形态差异和群落优势的细菌分属于 4 门 5 纲 16 目 24 科 38 属 113 种。在纲水平上  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)丰度最高, 共 453 株, 占总分离株的 86.1%; 在属水平上弧菌属(*Vibrio*)丰度最高, 共 369 株, 占总分离株的 70.2%; 在种水平上, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为最优势种, 共 112 株, 占总分离株的 21.3%, 并且分布于整个繁育系统, 在饵料中具有最高丰度。多元关联分析表明, 随着对虾幼体的发育, 饵料对幼体内可培养细菌的菌群结构影响逐渐增加。对 112 株潜在溶藻弧菌的 MLSA 分析表明, 其中 100 株

资助项目: 山东省重点研发计划(科技示范工程)课题(2021SFGC0701); 山东省泰山产业领军人才项目(LJNY201802); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD40, 2022GH02)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021SFGC0701), the Project of Taishan Industry Leading Talent Project of Shandong Province (LJNY201802), and the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD40, 2022GH02).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-85817991, E-mail: yuyx@ysfri.ac.cn

Received: 2022-11-22; Accepted: 2023-02-17; Published online: 2023-03-03

菌株进一步确认为溶藻弧菌。进一步利用 MLSA 构建系统发育树分析其遗传多样性发现, 100 株溶藻弧菌分为 9 个簇, 分离自同类样品的菌株广泛分布在不同的簇中。【结论】在 BVS 发生时期, 凡纳滨对虾工厂化繁育系统中具有丰富的可培养微生物种类。对虾幼体发育过程中, 饵料对幼体体内可培养细菌的菌群结构具有重要影响。溶藻弧菌为凡纳滨对虾工厂化繁育系统中的优势弧菌, 分布于整个繁育系统, 且具有丰富的遗传多样性。本研究为解析对虾繁育系统可培养微生物演替规律提供了数据支撑, 也为对虾苗期病原防控和健康养殖提供了科学依据。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 工厂化繁育; 细菌性玻化症(BVS); 菌群结构; 多位点序列分析(MLSA); 溶藻弧菌

## Microbial community structure and genetic diversity of dominant bacteria in *Litopenaeus vannamei* breeding system

TANG Miaomiao<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2,3</sup>, WANG Chunyuan<sup>2,3</sup>, ZHANG Zheng<sup>2,3</sup>, LIAO Meijie<sup>2,3</sup>, LI Bin<sup>2,3</sup>, RONG Xiaojun<sup>2,3</sup>, GE Jianlong<sup>2,3</sup>, YU Yongxiang<sup>2,3\*</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

3 Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the characteristics of culturable microorganisms and the genetic diversity of dominant pathogens during shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome (BVS) of *Litopenaeus vannamei* in the factory breeding system. **[Methods]** The composition and structural characteristics of culturable bacterial communities in shrimp (parent shrimp, fertilized egg, nauplius, zoea, mysis, and postlarva), water, and bait samples at different breeding stages were studied by *in vitro* bacterial culture method combined with gene sequencing technology, and the genetic diversity of the pathogenic bacteria was studied by multilocus sequence analysis (MLSA). **[Results]** The 526 isolates with typical morphological differences and community dominance belonged to 113 species, 38 genera, 24 families, 16 orders, 5 classes, and 4 phyla. At the class level, *Gammaproteobacteria* had the highest abundance, with 453 isolates (86.1% of the total isolates). At the genus level, *Vibrio* had the highest abundance, with 369 isolates (70.2%). At the species level, *V. alginolyticus* was the most dominant species, with 112 isolates (21.3%). *V. alginolyticus* was distributed in the whole breeding system and had the highest abundance in the baits. The multiple correlation analysis showed that the influence of baits on the structure of culturable bacterial community increased gradually with the development of larvae. The MLSA confirmed 100 out of the 112 potential isolates as *V. alginolyticus*. MLSA was further employed to construct a phylogenetic tree for revealing the genetic diversity of the isolates. The 100 *V. alginolyticus* isolates were classified into 9 clusters, and the isolates from the same type of samples showed dispersed distribution in different clusters. **[Conclusion]** During the occurrence of BVS, abundant culturable

microorganisms existed in the factory breeding system of *L. vannamei*. The baits exerted effect on the structure of culturable bacterial community in the larvae. *V. alginolyticus* was the dominant species of *Vibrio* in the factory breeding system of *L. vannamei*, with wide distribution and high genetic diversity in the breeding system. The results of this study provide data support for analyzing the succession rules of culturable microorganisms in shrimp breeding system and lays a foundation for pathogen prevention and control and healthy breeding of shrimp.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*; factory breeding; shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome (BVS); microbial community structure; multilocus sequence analysis (MLSA); *Vibrio alginolyticus*

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国乃至全世界对虾养殖产量最高的种类<sup>[1]</sup>。据统计,2020年我国对虾总产量为215.3万t,其中186.3万t为凡纳滨对虾,占总对虾养殖产量的86.5%,同时凡纳滨对虾苗种产量高达1.56万亿尾,比2019年增加了3.61%<sup>[2]</sup>。健康优质苗种的持续供应是保障我国对虾养殖产业可持续发展的首要因素。但随着对虾大规模集约化繁育与养殖技术的不断发展,对虾苗种繁育过程中细菌病、病毒病、寄生虫病等病害问题也日趋严重<sup>[3-4]</sup>。对虾育苗过程中,育苗系统相对封闭,幼体密度高;同时由于饵料、残骸和排泄物积累,细菌大量滋生,极易造成育苗期幼体细菌性疾病暴发<sup>[5]</sup>。近年来,对虾育苗期间细菌性疾病频发,导致对虾苗种大量死亡,从而造成巨大的经济损失。例如,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、新喀里多尼亚弧菌(*V. neocaledonicus*)或副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)感染可导致虾苗细菌性玻化症(shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome, BVS),虾苗出现症状后24h内便大部分死亡,该疾病在北部湾发生以后,在我国自南向北沿海呈现爆发性蔓延趋势,导致春季虾苗供应严重不足,使得我国沿海对虾养殖区遭受到严重的经济损失<sup>[6-7]</sup>。可见,对虾苗种细菌性疾病问题逐渐成为限制对虾苗种产业健康发展的重要因素。

微生物是水产养殖生态系统的重要组成部分,在物质循环、能量流动、水质控制和维持生

态平衡中起着至关重要的作用<sup>[8-10]</sup>。在对虾养殖系统中,环境菌群的组成对对虾体内的微生物群落有很大影响<sup>[11]</sup>。而对虾和细菌共享同一水环境,对虾体内的细菌组成受到水中菌群的影响<sup>[12]</sup>。此外,以饵料为主的外源投入品可通过对虾摄食进而影响对虾体内的菌群组成,并且,过量或残余饵料的积累也会进一步影响水体菌群结构<sup>[13]</sup>。目前,关于对虾育苗系统菌群的研究主要集中在幼虾肠道<sup>[13]</sup>和水体菌群<sup>[14]</sup>,但对于整个育苗系统包括不同发育时期的虾苗、水体、饵料等可培养微生物菌群特征进行的研究报道很少。因此,全面了解对虾繁育系统中不同培育阶段和环境可培养细菌的群落组成及优势菌株在不同样品中的遗传多样性,对于深入了解对虾苗种健康水平及潜在病原菌的防控具有重要意义。

本研究选择海南和广东省正值发生BVS的2家大型对虾苗种场为采样点,以凡纳滨对虾工厂化繁育系统中种虾培育、苗种繁育、养殖环境系统及外源投入品为调查对象,通过细菌体外培养并结合细菌鉴定与遗传关联分析等研究方法,对对虾繁育系统内可培养细菌菌群的组成与结构特征进行研究,比较分析不同繁育阶段虾苗体内菌群与环境菌群(饵料及繁育用水)的相关性,并解析了对虾繁育系统中溶藻弧菌的遗传多样性。相关研究结果为对虾育苗期疾病的防控和优质苗种培育提供了理论依据。

# 1 材料与方 法

## 1.1 不同对虾苗种繁育阶段样品的采集和处理

2021 年 4–6 月, 以海南和广东省正值发生 BVS 的 2 家大型对虾苗种场为采样点, 以凡纳滨对虾工厂化繁育系统为研究对象, 分别采集不同发育阶段的对虾、繁育用水和饵料共 3 种类别样品。其中对虾样品包括种虾(parent shrimp, PS)、受精卵(fertilized egg, FE)、无节幼体(nauplius, NP)、蚤状幼体(zoea, ZA)、糠虾幼体(mysis, MS)和仔虾(postlarvae, PL); 繁育用水样品包括种虾繁育用水(parent shrimp breeding water, PSW)、受精卵孵化水(fertilized egg incubation water, FEW)、无节幼体繁育用水(nauplius breeding water, NW)、蚤状幼体繁育用水(zoea breeding water, ZW)、糠虾幼体繁育用水(mysis breeding water, MW)和仔虾繁育用水(postlarvae breeding water, PLW); 饵料样品包括生物饵料[种虾饵料沙蚕(clam worm, CW)和冰冻鱿鱼(frozen squid, FS)、幼体饵料微藻(microalgae, MA)和卤虫(brine shrimp, BS)]和虾苗配合饲料[虾片(XP)]。

用灭菌筛绢网从种虾繁育池随机选取 5 尾种虾, 从不同繁育阶段的孵化池和幼体繁育池随机采集一定量的受精卵、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾, 同步采集繁育系统内的繁育用水样品以及各阶段投喂的饵料样本, 包括生物饵料(沙蚕、冰冻鱿鱼、微藻、卤虫)和虾苗配合饲料(虾片)。对虾和生物饵料样品用无菌 1.5% NaCl 溶液冲洗 3–5 次后, 用无菌纱布吸干表面水分, 低温带回基地实验室进行分析。无菌条件下对采集到的种虾样品进行解剖, 取出肝胰腺和肠道并分别进行混合。

随机称取对虾(亲虾肠道和肝胰腺、受精卵、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾)和饵料(沙

蚕、冰冻鱿鱼、微藻、卤虫和虾片)样品各 0.5 g, 加入 1 mL 无菌 1.5% NaCl 溶液, 在无菌条件下, 研磨成匀浆原液, 然后依次进行 10 倍梯度稀释, 同步对繁育用水样品进行 10 倍梯度稀释。吸取每个样品稀释液各 100  $\mu$ L 进行胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)琼脂平板涂布, 每个样品设置 3 组平行试验, 于 28  $^{\circ}$ C 培养箱内培养。

## 1.2 菌株的分离纯化和鉴定

将涂布后的 TSB 和 TCBS 平板置于 28  $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h 后, 参照孙创等<sup>[15]</sup>的方法并进行改良后, 进行菌株的分离纯化。具体操作如下, 根据菌落形状、颜色、大小、透明度、边缘特征等, 挑取不同类别的单菌落重新接种于 TSB 琼脂平板进行细菌纯化培养。将纯化 3 次的菌株用灭菌枪头刮取, 与保种液(含有 1.5% NaCl 的 20% 甘油溶液)混合, 反复吹打至均匀状态, 用封口膜密封后, 置于–80  $^{\circ}$ C 保藏。

挑取纯化培养的细菌单菌落重悬于 100  $\mu$ L 无菌去离子水内并反复吹打均匀, 99  $^{\circ}$ C 金属浴 15 min 后, 置于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 5 min, 吸取上清, 使用分光光度计(NanoDrop 1000)测定上清中 DNA 浓度并用无菌去离子水将其调整至 100 ng/ $\mu$ L, 用作 PCR 模板 DNA, 并用通用引物 27F/1492R<sup>[16]</sup>进行 16S rRNA 基因序列扩增。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)为: 2 $\times$ Master Mix 25.0  $\mu$ L, 上下游引物各 1.0  $\mu$ L, 模板 DNA 1.0  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 22.0  $\mu$ L。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 72  $^{\circ}$ C 温育 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后进行测序, 并通过 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对分析, 最后对各样品中的菌株进行汇总及鉴定分类。

### 1.3 可培养微生物菌群特征分析

依据细菌鉴定结果,分析对虾繁育体系中可培养细菌在纲(class)、属(genus)、种(species) 3 个分类水平上的相对丰度,解析凡纳滨对虾工厂化繁育系统中可培养细菌的多样性特征;统计不同类别样品中分离菌株在纲、属和种水平上的相对丰度,分析不同类别样品中可培养微生物的群落组成及差异。所有统计工作、饼状图和柱状图均通过 Excel 完成,热图和 Upset 图通过 omicshare 云平台 (<https://www.omicshare.com/>)中的相关工具完成。

### 1.4 不同繁育阶段虾体内菌群和环境菌群相关性分析

通过主成分分析 (principal component analysis, PCA),研究不同繁育阶段对虾体内菌群与环境菌群各样本的相关性。通过不同繁育阶段虾体样品与环境样品之间的距离,比较分析不同时期对虾苗种培育系统中虾体与环境可培养细菌的相关性。PCA 分析通过 omicshare 云平台 (<https://www.omicshare.com/>)内动态 PCA 工具完成。

### 1.5 优势弧菌 MLSA 鉴定和遗传相似性分析

以在不同阶段的凡纳滨对虾繁育系统中广

泛分布的优势菌—溶藻弧菌为研究对象,根据 Rahman 等<sup>[17]</sup>报道的弧菌鉴定技术,选取 *gyrB*、*pyrH*、*recA* 和 *atpA*,并参考 Sawabe 等<sup>[18]</sup>的研究结果,选取 *topA* 和 *gapA*,共计 6 个管家基因为目的基因,对不同来源的溶藻弧菌做进一步的多位点序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA)鉴定,引物信息和扩增条件见表 1。选取 *V. alginolyticus* ATCC 17749 以及哈维氏簇群 (*Harveyi* clade)中的 *V. azureus* DSM23306、*V. campbellii* ATCC 25920、*V. harveyi* ATCC35084、*V. jasicida* JCM16453、*V. mytili* LMG19147、*V. natriegens* ATCC 14048、*V. parahaemolyticus* ATCC 17802、*V. rotiferianus* DSM 17186 共 9 株标准菌株为参考菌株。通过 MEGA 7.0 内的 clustal W 进行基因序列对齐<sup>[19]</sup>,然后使用 PhyloSuite<sup>[20]</sup>串联管家基因 *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA*。采用邻接(neighbor-joining, NJ)法<sup>[21]</sup>,以 kimura 2-pammeter 为核苷酸替代模型,bootstrap (1 000 次重复)为检验方法<sup>[22]</sup>,构建系统发育树,并通过 iTOL (<https://itol.embl.de/>)进行可视化处理<sup>[23]</sup>。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information of this study

Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon length (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
16S rRNA	F: GAGTTTGATCCTGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 500	55	[16]
<i>gyrB</i>	F: GAAGGTGGTATTCAAGCGTT R: CGGTCATGATGATGATGTTGT	570	52	[17]
<i>pyrH</i>	F: CCCTAAACCAGCGTATCAACGTATTC R: CGGATWGGCATTGTTGGTCACGWGC	501	59	[17]
<i>recA</i>	F: TCGCTAGGTCAAATTGAAA R: GTTTCWGGGTTACCRAACATYACACC	462	55	[17]
<i>atpA</i>	F: CTDAATTCHACNGAAATYAGYG R: TTACCARGWYTGTTGTC	489	51	[17]
<i>topA</i>	F: GAGATCATCGGTGGTGATG R: GAAGGACGAATCGCTTCGTG	800	55	[18]
<i>gapA</i>	F: AACTCACGGTCGTTTCAAC R: CGTTGTCGTACCAAGATAC	750	51	[18]

## 2 结果与分析

### 2.1 凡纳滨对虾繁育系统中可培养细菌的多样性分析

本研究共分离纯化可培养细菌 526 株, 其中 213 株分离自对虾, 167 株分离自繁育用水, 146 株分离自生物饵料, 虾苗配合饲料中未分离到任何细菌。经 16S rRNA 基因测序鉴定, 分离的 526 株细菌分属于 4 门 5 纲 16 目 24 科 38 属 113 种。

在纲水平上,  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)和放线菌纲(*Actinobacteria*)是丰度最高的 3 个纲, 分别为 453、56 和 11 株, 占总分离株的 86.1%、10.6%和 2.1% (图 1A)。在属水平上, 隶属于  $\gamma$ -变形菌纲的弧菌属为主导优势属, 共计 369 株, 分属于 34 个种, 占总分离菌株数量的 70.2%; 芽孢杆菌纲的芽孢杆菌属(*Bacillus*)为第二优势属, 共计 25 株, 分属于 9 个

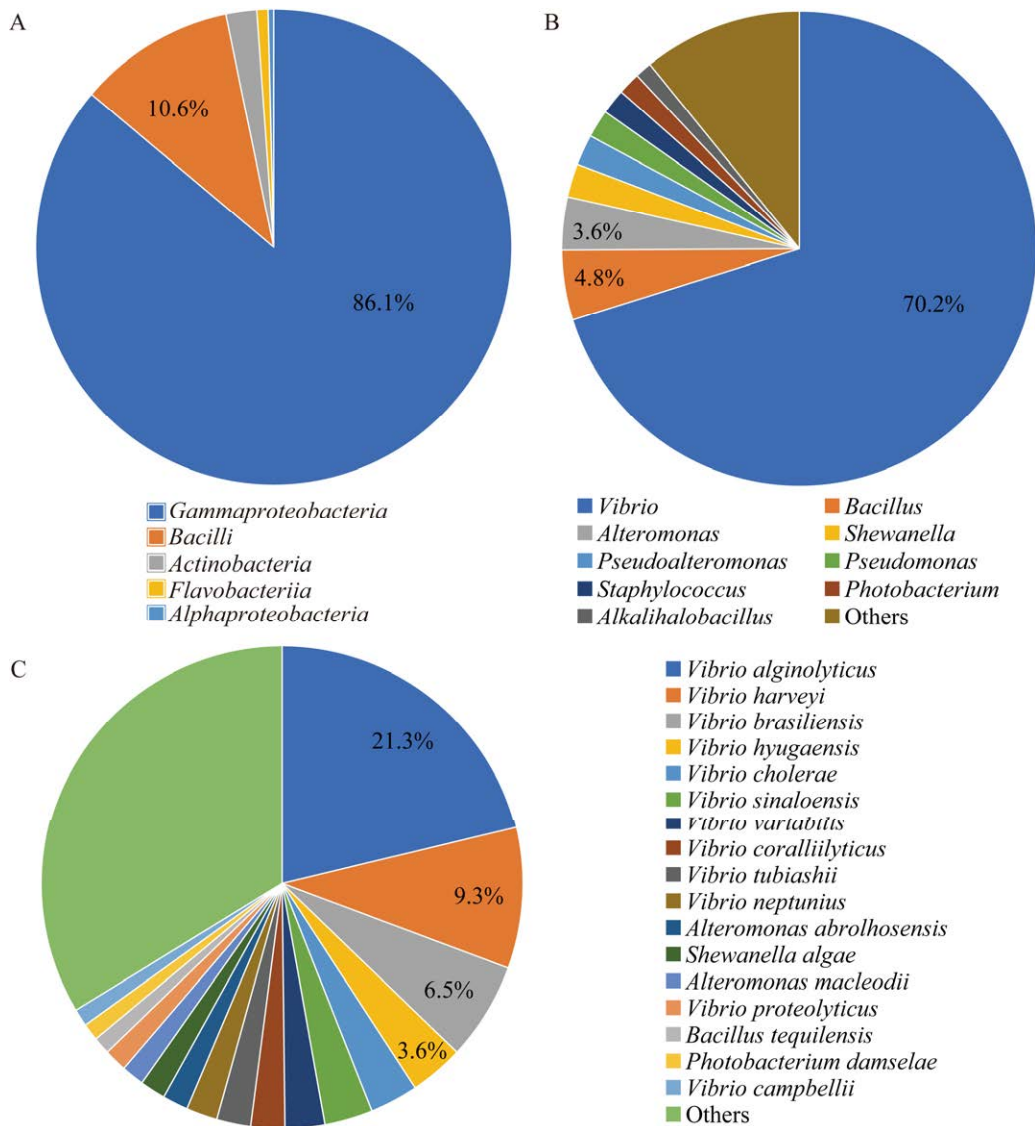


图 1 凡纳滨对虾工厂化繁育系统可培养细菌群落组成

Figure 1 Culturable bacterial community composition of *Litopenaeus vannamei* breeding system. A: Class level. B: Genus level. C: Species level.

种, 占总分离菌株的 4.8%;  $\gamma$ -变形菌纲的交替单胞菌属(*Alteromonas*)为第三优势菌属, 共计 19 株, 分属于 3 个种, 占总分离菌株的 3.6% (图 1B)。种水平上, 溶藻弧菌为最优势种, 共计 112 株, 占总分离菌株的 21.3%; 其次为哈维氏弧菌(*V. harveyi*)和巴西弧菌(*V. brasiliensis*), 分别占总分离菌株的 9.3%和 6.5% (图 1C)。

## 2.2 不同类别样品中可培养微生物的群落组成

在对虾、繁育用水和生物饵料样品中,  $\gamma$ -变

形菌纲和芽孢杆菌纲均是占主导优势的菌纲, 相对丰度分别达到 82.0%–92.0%和 7.5%–16.2% (图 2A), 并且  $\gamma$ -变形菌纲和芽孢杆菌纲在各繁育系统均有分布。在属水平上, 对虾、繁育用水和生物饵料样品各分离到 18、17 和 24 个属, 其中弧菌属分布于整个繁育系统, 在对虾体内具有最高相对丰度(78.4%), 在生物饵料中的相对丰度最低(64.4%) (图 2B)。第二优势属为芽孢杆菌属, 在繁育用水中相对丰度最高(9.0%)。在种水平上, 生物饵料样品包含最多数量的种(63), 其次为对虾

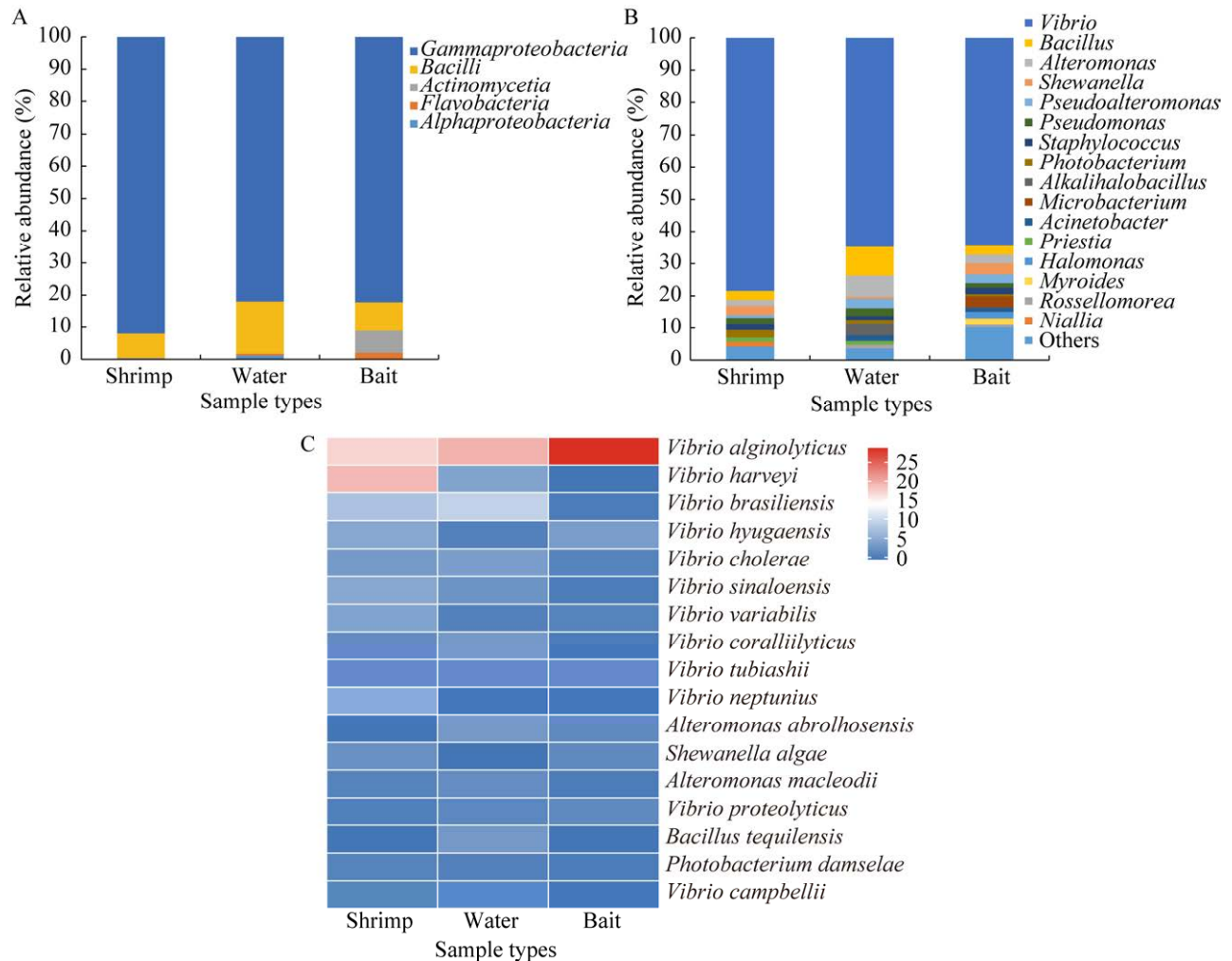


图 2 不同类别样品可培养微生物多样性

Figure 2 Culturable microbial diversity of different types of samples. A: Bar diagram of class level community structure of culturable microbiota from different types of samples. B: Bar diagram of genus level community structure of culturable microorganisms of different types of samples. C: Heatmap diagram of species level community structure of culturable microorganisms of different types of samples (Top 17 species in relative abundance).

(54)和繁育用水(53), 不同类别样品的优势种具有一定差异(图 2C)。对虾样品的优势种为哈维氏弧菌(19.2%)和溶藻弧菌(17.4%), 繁育用水为溶藻弧菌(19.8%)和巴西弧菌(9.6%), 生物饵料为溶藻弧菌(28.8%)和 *V. hyugaensis* (4.1%), 其中溶藻弧菌分布于整个繁育系统, 在生物饵料中具有最高相对丰度。

### 2.3 不同繁育阶段对虾体内菌群与环境菌群相关性

在属水平上进行各样本相关性的 PCA 分析(图 3)。第 1 主成分(PC1)对样品差异的贡献值为 62.6%, 第 2 主成分(PC2)对样品差异的贡献值为 20.1%。根据不同发育期各样本所处的位置可以看出, 相比于 PC1, PC2 对亲虾、受精卵、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾时期差异均具有较大贡献。根据相同时期幼体与繁育用水和饵料所处的位置可以看出, 受精卵阶段和无节幼体时期, 幼体与繁育用水菌群相距较远; 随着幼体发育, 幼体与繁育用水的距离变小, 蚤状幼体后幼体与繁育用水菌群之间的距离无明显变化; 蚤状幼体时期, 幼体菌群与繁育用水菌群相距小于其与饵料(MA)菌群的距离, 表明繁育用水对蚤状幼体菌群影响较大; 随着幼体的发育, 当发育到糠虾幼体时, 幼体菌群与饵料(BS)菌群相距小于其与繁育用水菌群的距离, 表明饵料对糠虾幼体菌群影响较大; 当发育到仔虾时, 幼体菌群与饵料(BS)菌群相距小于其与繁育用水菌群的距离, 且幼体菌群与饵料距离变小, 表明幼体菌群受饵料影响逐渐增加。

### 2.4 不同来源溶藻弧菌遗传多样性分析

为进一步研究对虾繁育过程中种虾培育、仔虾繁育、外源投入品和养殖环境中的微生物遗传多样性, 以可培养微生物中检出率最高的溶藻弧菌为对象, 对来源于不同样品中的溶藻弧菌遗传多样性进行比较分析。

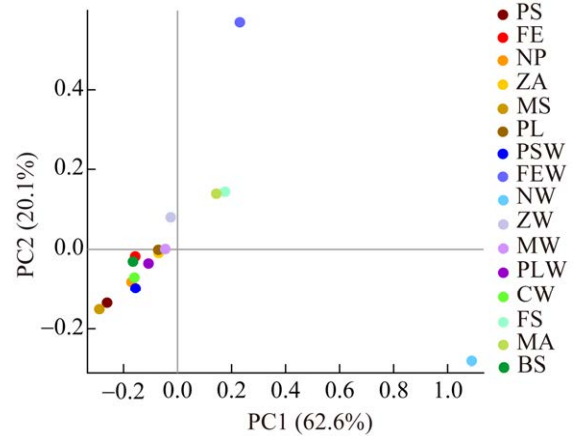


图 3 不同繁育阶段对虾体内菌群与环境菌群差异的主成分分析

Figure 3 Principal component analysis of the microflora difference between the shrimp bodies and environment at different breeding stages. PS: Parent shrimp; FE: Fertilized egg; NP: Nauplius; ZA: Zoea; MS: Mysis; PL: Postlarvae; PSW: Parent shrimp breeding water; FEW: Fertilized egg incubation water; NW: Nauplius breeding water; ZW: Zoea breeding water; MW: Mysis breeding water; PLW: Postlarvae breeding water; CW: Clam worm; FS: Frozen squid; MA: Microalgae; BS: Brine shrimp.

经 16S rRNA 基因鉴定, 弧菌属的 369 株菌株中, 共获得 112 株潜在溶藻弧菌。基于 *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA* 的 MLSA 系统发育分析表明, 其中有 100 株与溶藻弧菌标准菌株 ATCC 17749 (Val) 聚为一支(图 4)。然后通过溶藻弧菌特异性引物 *gyrB*<sup>[24]</sup> 对这 100 株菌株进行 PCR 扩增, 通过凝胶电泳进行检测均为阳性, 进一步证明这 100 株菌为溶藻弧菌。其中 29 株来自对虾, 32 株来自繁育用水, 39 株来自生物饵料。

随后参考 Kawaguchi 等<sup>[25]</sup>和曾德乾<sup>[26]</sup>的方法, 进一步对鉴定为溶藻弧菌的 100 株菌株, 构建基于 *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA* 的系统发育树, 分析其遗传多样性。结果表明这 100 株溶藻弧菌菌株形成了 9 个不同的簇(a-i) (图 5)。簇 a 包含 11 株菌株, 其中 8 株分离自对虾,



1 株分离自繁育用水, 2 株分离自生物饵料; 簇 b 包含 11 株菌株, 6 株分离自对虾, 4 株分离自繁育用水, 1 株分离自生物饵料; 簇 c 包含 5 株菌株, 2 株分离自对虾, 3 株分离自繁育用水;

簇 d 仅包含 1 株菌株 FEW1, 分离自繁育用水; 簇 e 包含 19 株菌株, 4 株分离自对虾, 9 株分离自繁育用水, 6 株分离自生物饵料; 簇 f 包含 5 株菌株, 3 株分离自对虾, 2 株分离自繁育用水;

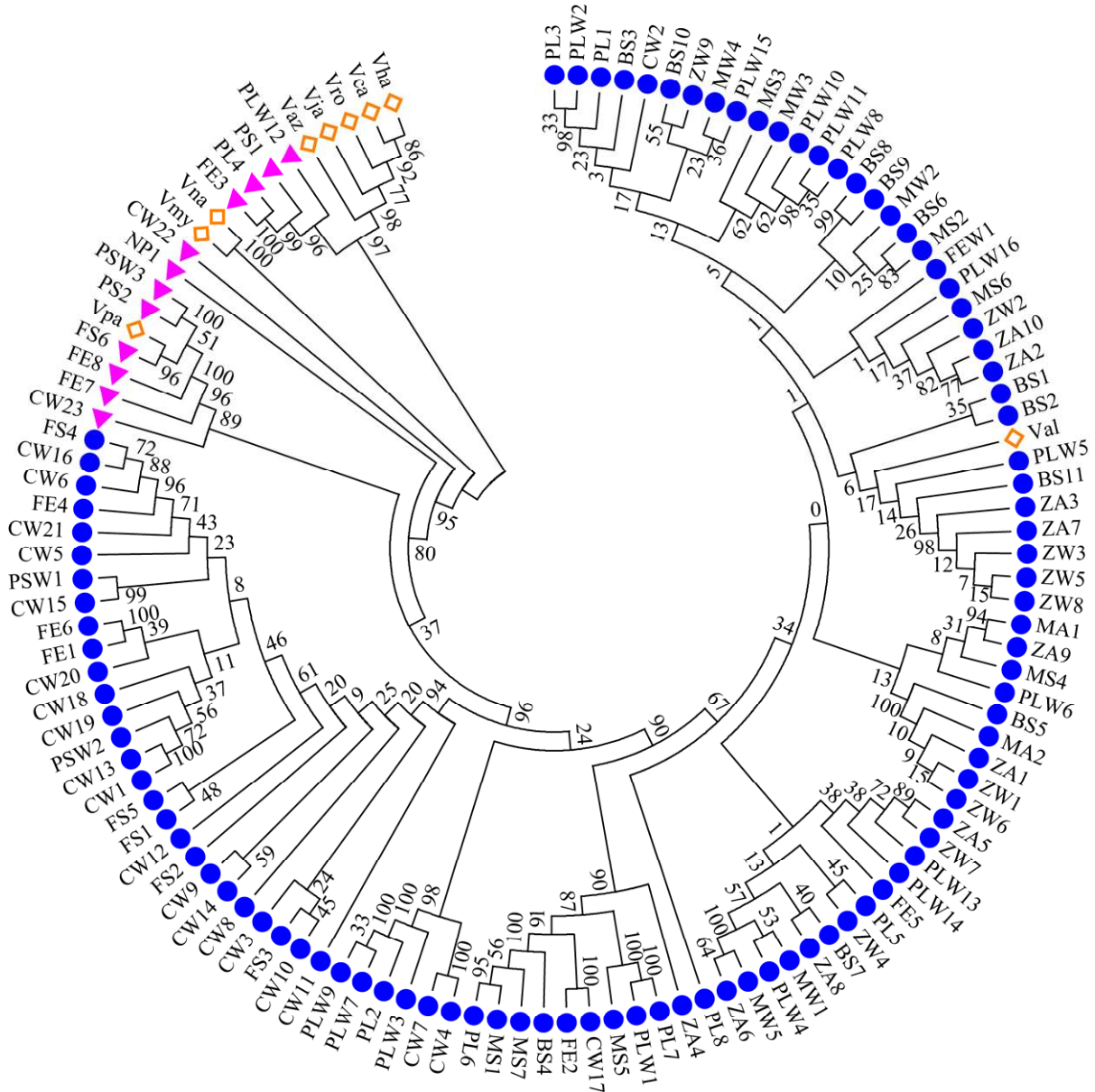


图 4 基于 *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA* 构建的 112 株潜在溶藻弧菌系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 112 potential *Vibrio alginolyticus* isolates based on *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA*. ●: *V. alginolyticus*; ▲: Other *Vibrio* spp.; ◆: Reference strains; Val: *V. alginolyticus* ATCC 17749; Vaz: *V. azurea* DSM23306; Vca: *V. campbellii* ATCC25920; Vha: *V. harveyi* ATCC35084; Vja: *V. jasicida* JCM16453; Vmy: *V. mytili* LMG19147; Vna: *V. natriegens* ATCC 14048; Vpa: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; Vro: *V. rotiferianus* DSM 17186.

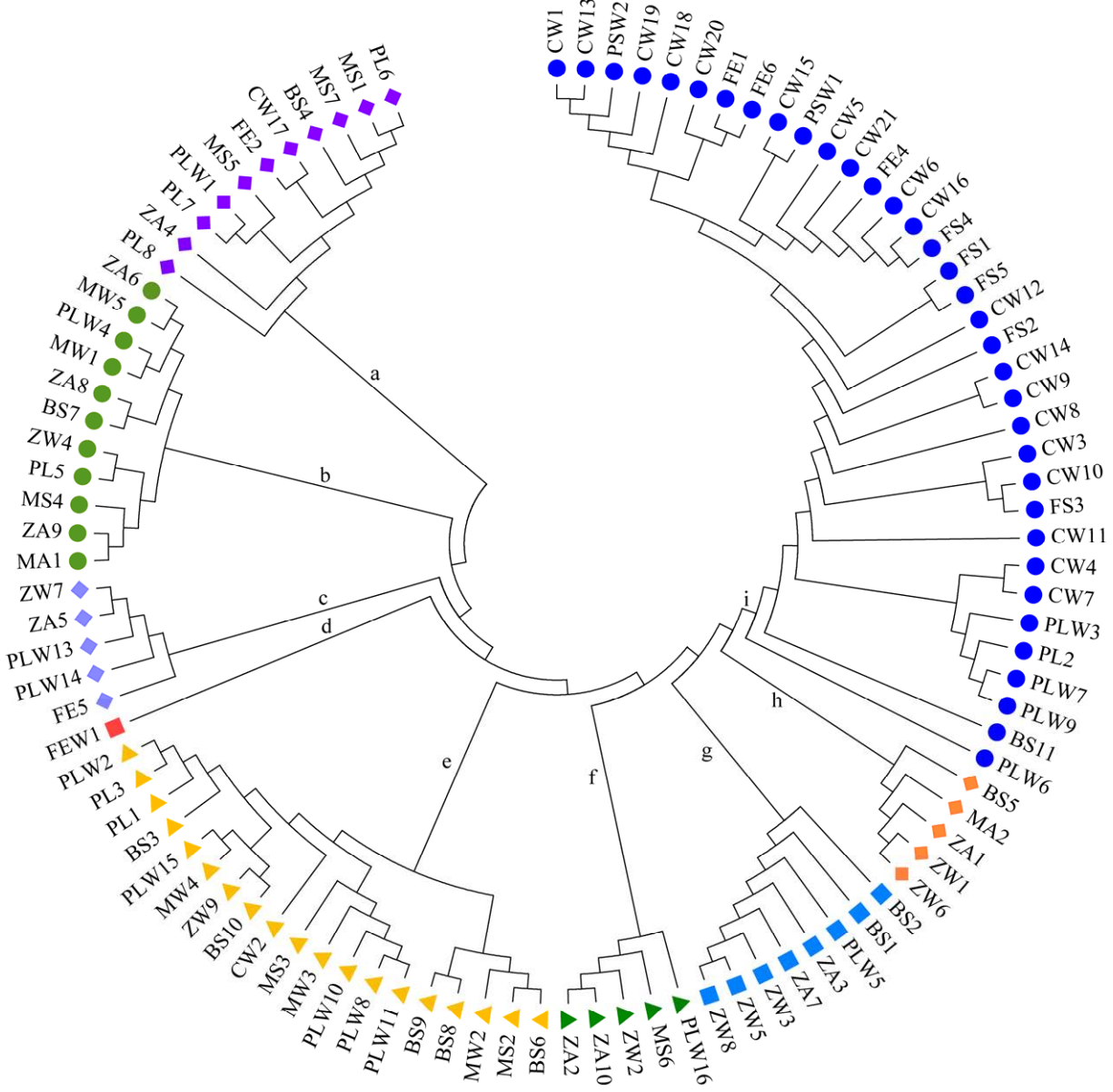


图 5 基于 *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA* 的 100 株溶藻弧菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of 100 *Vibrio alginolyticus* isolates based on *gyrB-pyrH-recA-atpA-gapA-topA*. ◆: Cluster a; ●: Cluster b; ◆: Cluster c; ■: Cluster d; ▲: Cluster e; ▲: Cluster f; ■: Cluster g; ◆: Cluster h; ●: Cluster i.

簇 g 包含 8 株菌株, 2 株分离自对虾, 4 株分离自繁育用水, 2 株分离自生物饵料; 簇 h 包含 5 株菌株, 1 株分离自对虾, 2 株分离自繁育用水, 2 株分离自生物饵料; 簇 i 包含 35 株菌株, 4 株

分离自对虾, 6 株分离自繁育用水, 25 株分离自生物饵料。

就分离样品而言, 分离自对虾的溶藻弧菌在簇 a-c 和簇 e-i 的 8 个簇中均有分布, 主要分布

在簇 a 和簇 b 中;分离自繁育用水的溶藻弧菌在簇 a-i 的 9 个簇中均有分布, 主要分布在簇 e 和簇 i 中;分离自生物饵料的溶藻弧菌分布在簇 a、簇 b、簇 e 和簇 g-i 的 6 个簇中, 主要分布在簇 i 中。可见, 分离自不同类别样品的菌株可以聚为同一簇, 分离自相同类别样品的菌株也可以分布在不同的簇中。进一步分析分离自相同时期幼体和繁育用水的溶藻弧菌在各簇中的分布发现, 分离自受精卵的溶藻弧菌分布在簇 a (FE2)、簇 c (FE5)和簇 i (FE1、FE4、FE6)中, 而分离自受精卵孵化水的溶藻弧菌菌株 FEW1 独自形成簇 d; 分离自蚤状幼体的溶藻弧菌分布在簇 a (ZA4)、簇 b (ZA6、ZA8、ZA9)、簇 c (ZA5)、簇 f (ZA2、ZA10)、簇 g (ZA3、ZA7)和簇 h (ZA1)中, 分离自蚤状幼体繁育用水的溶藻弧菌分布在簇 b (ZW4)、簇 c (ZW7)、簇 e (ZW9)、簇 f (ZW2)、簇 g (ZW3、ZW5、ZW8)和簇 h (ZW1、ZW6)中; 分离自糠虾幼体的溶藻弧菌分布在簇 a (MS1、MS5、MS7)、簇 b (MS4)、簇 e (MS2、MS3)和簇 f (MS6)中, 分离自糠虾幼体繁育用水的溶藻弧菌分布在簇 b (MW1、MW5)和簇 e (MW2、MW3、MW4)中; 分离自仔虾的溶藻弧菌分布在簇 a (PL6、PL7、PL8)、簇 b (PL5)、簇 e (PL1、PL3)和簇 i (PL2)中, 分离自仔虾繁育用水的溶藻弧菌分布在簇 a (PLW1)、簇 b (PLW4)、簇 c (PLW13、PLW14)、簇 e (PLW2、PLW8、PLW10、PLW11、PLW15)、簇 f (PLW16)、簇 g (PLW5)和簇 i (PLW3、PLW6、PLW7、PLW9)中。可见, 分离自同一发育时期幼体或繁育用水的溶藻弧菌菌株未聚类在同一簇中, 分离自相同时期幼体和繁育用水的溶藻弧菌菌株也并未全都聚类在同一簇中。以上结果表明, 来源不同的溶藻弧菌分离株可以具有相似的基因型, 而来源相同的溶藻弧菌分离株的基因型也会存在差异。

### 3 讨论与结论

对虾苗种培育的成败关乎对虾养殖产业发展的可持续性, 健康稳定的繁育生态系统才可能保证苗种的健康。对虾生活在水体环境中, 与水体中的微生物种群直接接触, 且对虾摄入饵料中的细菌也会影响对虾肠道微生物菌群的结构特征<sup>[27]</sup>, 同时, 饵料投喂时要先接触水, 残留的饵料也积累在水中影响水体菌群<sup>[13]</sup>。深入研究的对虾繁育不同阶段的微生物组成及其遗传多样性, 对于系统了解对虾繁育过程中菌群结构变化情况及其主要的外源干扰因子, 建立对虾病原防控技术具有重要的指导意义。

本研究通过传统细菌学培养方法和基因测序技术研究了凡纳滨对虾工厂化繁育系统发生 BVS 时期可培养细菌的菌群特征。结果表明, 凡纳滨对虾工厂化繁育系统内不同培育阶段样品内分离的 526 株菌株隶属于 4 门 5 纲 16 目 24 科 38 属 113 种, 表明凡纳滨对虾工厂化繁育系统内微生物种类丰富。Zheng 等<sup>[28]</sup>对不同健康状况和生长期的凡纳滨对虾幼体和水样中的可培养细菌研究发现, 健康对虾幼体和水样的优势属分别为南海海杆菌属 (*Meridianimaribacter*)和 *Nautella* 属。而本研究发现患 BVS 对虾繁育系统中的最优势属为弧菌属, 芽孢杆菌属为第二优势属。此外, 杨坤杰等<sup>[14]</sup>的研究发现, 患病幼虾消化道中弧菌属的分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 平均丰度高于健康幼虾。因此, 本研究中在对虾繁育系统中弧菌属的大量存在可能是对 BVS 发生的响应。芽孢杆菌是水产养殖行业应用最广泛的益生菌之一, 常常作为微生态制剂在水产养殖中用于促进生长、提高存活率、改善水质和提高免疫力等<sup>[29]</sup>。芽孢杆菌属具有较大优势

的原因可能是在对虾繁育过程中大量使用了芽孢杆菌类微生态制剂。在种水平上, 溶藻弧菌为最优势种, 且分布于整个繁育系统, 在生物饵料中具有最高相对丰度。王印庚等<sup>[6]</sup>的研究发现溶藻弧菌、新喀里多尼亚弧菌或副溶血弧菌是 BVS 的主要致病菌。此外, 生物饵料中溶藻弧菌检出率最高, 表明生物饵料可能是对虾繁育系统中溶藻弧菌的重要来源, 对此需要作进一步研究进行证实。

本研究通过 PCA 分析不同繁育阶段对虾体内菌群与养殖系统中繁育用水和饵料菌群的相关性发现, 在蚤状幼体前, 随着幼体的发育幼体菌群与繁育用水的相关性变大。随着对虾的发育到蚤状幼体后体内菌群与饵料之间的相关性大于繁育用水, 且随着幼体的发育, 相关性变强。对虾无节幼体阶段之后, 开始以生物饵料为食, 这使得来自外部的细菌开始在宿主肠道中繁衍<sup>[30]</sup>, 之后幼体体内细菌组成随着每个阶段所需的饮食变化而剧烈变化<sup>[31]</sup>。因此, 在对虾幼体发育过程中, 饵料会对幼体的菌群产生重要影响。在其他水生生物中也发现了相似的报告, 史秀清等<sup>[32]</sup>对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道的可培养细菌菌群进行研究, 在大菱鲂整个育苗生产过程中, 生物饵料中的细菌对仔稚鱼消化道中可培养菌群结构的形成产生的影响比水中的细菌相对较大。李靖等<sup>[33]</sup>对早期发育阶段刺参(*Apostichopus japonicus*)的研究结果表明, 在海参幼体发育初期, 其体内菌群与繁育用水的相关性较大, 而随着幼体发育的进行, 其体内菌群结构与饵料的相关性逐渐增加。但也有学者通过研究发现, 养殖水体中菌群对水生动物消化道菌群具有显著影响。Tanasonwang 等<sup>[34]</sup>研究牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚鱼时发现, 水中的菌群组成会明显影响仔稚鱼消化道的

菌群组成。

利用管家基因进行 MLSA 鉴定的技术具有良好的分辨率、可积累性与重复性, 已被越来越多地应用于弧菌属的系统进化与分类鉴定上<sup>[35]</sup>。本研究发现, 溶藻弧菌是不同繁育阶段对虾繁育系统中均存在的优势弧菌种类。且现有报道也表明溶藻弧菌是 BVS 的重要致病源<sup>[6]</sup>。为进一步研究对虾繁育系统中溶藻弧菌的遗传多样性, 本研究对 112 株潜在溶藻弧菌进一步进行了 MLSA 鉴定, 共 100 株溶藻弧菌被进一步确认为溶藻弧菌。随后通过 MLSA 方法构建系统发育树, 分析了其遗传多样性, 结果显示 100 株溶藻弧菌分为 9 个簇, 而且分离自同类样品的菌株广泛分布在不同的簇中, 表明我国凡纳滨对虾工厂化繁育系统内溶藻弧菌具有丰富的遗传多样性。同样地, Warner 等<sup>[36]</sup>认为包括溶藻弧菌在内的多种弧菌具有很强的遗传多样性。此外, 陈岱等<sup>[37]</sup>通过随机扩增 DNA 多态性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术对三亚、陵水等热带海区养殖场内溶藻弧菌的遗传多样性进行研究, 我国热带海区养殖场内的溶藻弧菌具有非常高的遗传多样性, 本研究结果与之一致。

综上所述, 本研究对凡纳滨对虾工厂化繁育系统内发生细菌性玻化症 (BVS) 时期可培养微生物的菌群特征以及优势病原菌的遗传多样性进行分析, 结果表明对虾繁育系统中具有丰富的可培养微生物种类。对虾幼体发育过程中, 饵料对幼体体内可培养细菌的菌群结构具有重要影响。溶藻弧菌为对虾繁育系统中的优势弧菌, 且具有丰富的遗传多样性。相关研究结果为对虾繁育系统中病原菌的控制和预防提供了数据支撑, 为对虾疾病防控、健康养殖发展提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] 郝登春. 正常和低盐度养殖条件下凡纳滨对虾收获体重基因型与环境互作效应分析[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2017.  
HAO DC. Genotype by environment interaction of harvest body weight of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in normal salinity and low salinity[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.  
Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. 2021 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [3] LEUNG TLF, BATES AE. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2013, 50(1): 215-222.
- [4] ZHOU JF, FANG WH, YANG XL, ZHOU S, HU LL, LI XC, QI XY, SU H, XIE LY. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with bacterial white tail disease of *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e29961.
- [5] 黄雪敏. 凡纳滨对虾育苗系统细菌资源挖掘及溶藻弧菌基因组初步分析[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2020.  
HUANG XM. Bacterial resource mining from larviculture system of *Litopenaeus vannamei* and primary genome analysis of *Vibrio alginolyticus* strains[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [6] 王印庚, 于永翔, 刘潇, 张永刚, 张正, 廖梅杰, 李彬, 蔡欣欣, 荣小军, 罗坤. 凡纳滨对虾育苗细菌性玻化症(BVS)的病原、病理分析[J]. *水产学报*, 2021, 45(9): 1563-1573.  
WANG YG, YU YX, LIU X, ZHANG YG, ZHANG Z, LIAO MJ, LI B, CAI XX, RONG XJ, LUO K. Pathogens and histopathological characteristics of shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome (BVS) in the *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(9): 1563-1573 (in Chinese).
- [7] ZOU Y, XIE GS, JIA TC, XU TT, WANG C, WAN XY, LI YX, LUO K, BIAN XD, WANG XH, KONG J, ZHANG QL. Determination of the infectious agent of translucent post-larva disease (TPD) in *Penaeus vannamei*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(9): 741.
- [8] NEWAJ-FYZUL A, AL-HARBI AH, AUSTIN B. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2014, 431: 1-11.
- [9] JOHN EM, KRISHNAPRIYA K, SANKAR TV. Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735390.
- [10] LIU ZD, QIUQIAN LL, YAO ZY, WANG X, HUANG L, ZHENG JL, WANG K, LI LG, ZHANG DM. Effects of a commercial microbial agent on the bacterial communities in shrimp culture system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2430.
- [11] SUN YF, HAN WF, LIU J, HUANG XS, ZHOU WQ, ZHANG JB, CHENG YX. Bacterial community compositions of crab intestine, surrounding water, and sediment in two different feeding modes of *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 16: 100236.
- [12] ZHOU L, QU YY, QIN JG, CHEN LQ, HAN FL, LI ER. Deep insight into bacterial community characterization and relationship in the pond water, sediment and the gut of shrimp (*Penaeus japonicus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736658.
- [13] 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[J]. *水产学报*, 2017, 41(5): 785-794.  
XUE M, HE YY, QIU MD, LIANG HF, CHEN DS, WANG LQ, LIU YF, WEN CQ. 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).
- [14] 杨坤杰, 王欣, 熊金波, 裘钱玲琳, 黄雷, 张化俊, 郭安南, 李来国, 张德民. 健康和患病凡纳滨对虾幼虾消化道菌群结构的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1765-1773.  
YANG KJ, WANG X, XIONG JB, QIU QLL, HUANG L, ZHANG HJ, GUO AN, LI LG, ZHANG DM. Comparison of the bacterial community structures

- between healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive tract[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(11): 1765-1773 (in Chinese).
- [15] 孙创, 王金燕, 张钰琳, 张蕴慧, 朱晓雨, 陈朝晖, 张晓华. 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 845-861.  
SUN C, WANG JY, ZHANG YL, ZHANG YH, ZHU XY, CHEN ZH, ZHANG XH. Exploring the diversity of cultivated bacteria in the western Pacific waters through improved culture media[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(4): 845-861 (in Chinese).
- [16] BYERS HK, STACKEBRANDT E, HAYWARD C, BLACKALL LL. Molecular investigation of a microbial mat associated with the Great Artesian Basin[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 25(4): 391-403.
- [17] RAHMAN MS, MARTINO ME, CARDAZZO B, FACCO P, BORDIN P, MIONI R, NOVELLI E, FASOLATO L. *Vibrio* trends in the ecology of the Venice lagoon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2372-2380.
- [18] SAWABE T, KITA-TSUKAMOTO K, THOMPSON FL. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(21): 7932-7936.
- [19] LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [20] ZHANG D, GAO FL, JAKOVLIĆ I, ZOU H, ZHANG J, LI WX, WANG GT. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(1): 348-355.
- [21] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [22] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [23] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [24] ZHOU S, HOU Z, LI N, QIN Q. Development of a SYBR green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1897-1906.
- [25] KAWAGUCHI A, SAWADA H, ICHINOSE Y. Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan[J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 747-753.
- [26] 曾德乾. 海水养殖鱼哈维弧菌分离株多位点序列分析及耐药谱型研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2014.  
ZENG DQ. Multilocus sequence analysis and antibiogram type research of *Vibrio harveyi* strains isolated from maricultured fishes[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [27] RUNGRASSAMEE W, KLANCHUI A, CHAIYAPECHARA S, MAIBUNKAEW S, TANGPHATSORNRUANG S, JIRAVANICHPAISAL P, KAROONUTHAISIRI N. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60802.
- [28] ZHENG YF, YU M, LIU Y, SU Y, XU T, YU MC, ZHANG XH. 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.
- [29] 李君丰, 吴垠. 不同种类微生态制剂在水产养殖中使用的有效性[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1147-1149.  
LI JF, WU Y. The effectiveness of different microecological preparations used in aquaculture[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(12): 1147-1149 (in Chinese).
- [30] JIRAVANICHPAISAL P, PUANGLARP N, PETKON S, DONNUEA S, SÖDERHÄLL I, SÖDERHÄLL K. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(4): 815-824.

- [31] ANGTHONG P, UENGWETWANIT T, ARAYAMETHAKORN S, CHAITONGSAKUL P, KAROONUTHAISIRI N, RUNGRASSAMEE W. Bacterial analysis in the early developmental stages of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 4896.
- [32] 史秀清, 张正, 王印庚, 于永翔, 邓威, 李华. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 73-82.
- SHI XQ, ZHANG Z, WANG YG, YU YX, DENG W, LI H. The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 73-82 (in Chinese).
- [33] 李靖, 廖梅杰, 李彬, 王印庚, 荣小军, 张正, 范瑞用, 刘安然. 养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的菌群特征及其与环境菌群相关性分析[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 122-131.
- LI J, LIAO MJ, LI B, WANG YG, RONG XJ, ZHANG Z, FAN RY, LIU AR. The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during the early developmental stage and its relationship with environmental flora[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 122-131 (in Chinese).
- [34] TANASOMWANG V, MUROGA K. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 55(8): 1371-1377.
- [35] THOMPSON FL, GOMEZ-GIL B, VASCONCELOS ATR, SAWABE T. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4279-4285.
- [36] WARNER JM, OLIVER JD. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1141-1144.
- [37] 陈偿, 胡超群, 张吕平, 沈琪, 陈晓燕, 任春华. 用 RAPD 技术对养殖环境溶藻弧菌遗传多样性的研究[J]. *热带海洋学报*, 2002, 21(4): 49-54.
- CHEN C, HU CQ, ZHANG LP, SHEN Q, CHEN XY, REN CH. DNA polymorphism of *Vibrio alginolyticus* isolated from culture environment, diseased fish and penaeid[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2002, 21(4): 49-54 (in Chinese).