

蒋 葛, 沈 辉, 万夕和, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合症病虾与健康虾肠道优势菌群比较分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 142-148.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.021

凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合症病虾与健康虾肠道优势菌群比较分析

蒋 葛^{1,2}, 沈 辉², 万夕和^{1,2}, 乔 毅², 黎 慧², 王李宝², 史文军²

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

摘要: 为研究急性肝胰腺坏死综合症 (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome, AHPNS) 病原对凡纳滨对虾肠道菌群的影响, 获取更多的 AHPNS 防治基础资料, 采用 PCR-RFLP 方法比较了江苏地区患 AHPNS 病虾和健康对虾肠道微生物群落。结果发现, 不同生长阶段病虾肠道中均只有弧菌属细菌; 对照的健康对虾中, 幼虾肠道优势菌为假单胞菌属、食酸菌属和固氮螺菌属细菌; 养殖中期对虾肠道优势菌为发光杆菌属、弧菌属和希瓦氏菌属细菌; 养殖后期对虾肠道优势菌为弧菌属、红杆菌属、莱茵海默氏菌属细菌。研究结果表明, 凡纳滨对虾患 AHPNS 后肠道微生物群落明显不同于健康对虾, 肠道菌群多样性遭到破坏, 弧菌为肠道内绝对优势细菌, 不同生长阶段健康对虾的肠道优势菌存在差异。本研究探究了 AHPNS 病原对于凡纳滨对虾肠道菌群的影响, 并为认识和防控 AHPNS 提供试验基础。

关键词: 对虾急性肝胰腺坏死综合症; 凡纳滨对虾; 肠道微生态

中图分类号: S945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0142-07

Difference analysis of intestinal flora between healthy *Litopenaeus vannamei* and acute hepatopancreatic necrosis syndrome *L. vannamei*

JIANG Ge^{1,2}, SHEN Hui², WAN Xi-he^{1,2}, QIAO Yi², LI Hui², WANG Li-bao², SHI Wen-jun²

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. China Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

Abstract: In order to study the effect of acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) pathogen on the intestinal microflora of *L. vannamei* and acquire more basic data for prevention and control of AHPNS, showed the difference between the intestinal microflora of AHPNS positive shrimp and healthy shrimp was compared by PCR-RFLP. The results showed that there were only *Vibrio* bacteria in intestine of diseased shrimp at different growth stages. Using healthy shrimp as control, dominant intestinal bacteria of juvenile shrimp were *Pseudomonas*, *Acidovorax* and *Brevundimonas*, and dominant

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: 江苏省渔业科技项目 (Y2017-20); 江苏省重点研发计划 (现代农业) 项目 (BE2017384); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(18)2010]; 南通市应用基础研究-民生项目 (MS12015076); 江苏省苏北科技发展计划项目 (BN2015120); 中央财政农业技术推广项目 (TG(16)099)

作者简介: 蒋 葛 (1993-), 男, 江苏溧阳人, 硕士研究生, 主要从事水生动物病原微生物学研究。 (Email) 18751322127@163.com。沈辉为共同第一作者。

通讯作者: 万夕和, (Email) wxh1708@163.com

intestinal bacteria of breeding mid-term shrimp were *Vibrio*, *Photobacterium* and *Shewanella*, dominant intestinal bacteria of breeding late shrimp were *Vibrio*, *Rhodobacteraceae* and *Rheinheimera*. The results showed that the intestinal microbial community of *L. vannamei* infected with AHPNS was significantly different from that of healthy *L. vannamei*, and the diversity of intestinal flora was destroyed. *Vibrio* was the dominant bacteria in the intestine, and there were differences in intestinal dominant

bacteria of healthy shrimp at different growth stages. This study explores the effect of AHPNS on intestinal flora, and provides experimental basis for recognition and prevention and control AHPNS.

Key words: acute hepatopancreatic necrosis syndrome; *Litopenaeus vannamei*; intestinal flora

急性肝胰腺坏死综合征 (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome, AHPNS) 是近年来影响凡纳滨对虾养殖业的一种重要疾病。2009 年该病在中国海南省发生, 越南、马来西亚、泰国、菲律宾相继暴发该病。2011 年以来, AHPNS 在中国广东、广西、福建、江苏等对虾主产区蔓延, 造成凡纳滨对虾产量锐减; 泰国、越南、墨西哥等凡纳滨对虾主产国的对虾产量也因该病的发生而受到严重影响^[1-4]。

凡纳滨对虾发生 AHPNS 后体色发白, 虾壳变软, 摄食明显减少, 活力减弱, 行动迟缓。对虾感染前期肝胰腺颜色暗淡苍白或糜烂发红, 异常肥大; 感染后期肝胰腺明显萎缩, 空肠空胃^[1]。苗种感染 10 d 就可发病死亡, 发病 3 d 内死亡率可达 100%。有研究结果显示, 一类携带有特定致病基因 *PirA* 和 *PirB* 的弧菌属细菌是该病发生的病原, 其中主要是副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)。病原弧菌含有的 *PirA* 和 *PirB* 基因会产生一种独特的二元毒素, 使靶细胞内外渗透压改变, 导致感染对象死亡。*PirA* 和 *PirB* 位于一段 69 kb 大小的隐藏质粒“pVA1”上, 该质粒含有转座子基因, 能发生水平基因转移, 被认为是 AHPNS 近年来传播较快的主要原因^[3-4]。目前, 尚未见 AHPNS 有效治愈的报道。

肠道菌群在维持对虾健康中发挥着重要作用, 对对虾的生长与免疫具有重要影响。对虾肠道菌群不仅可以分泌虾体所需的营养素, 而且可通过竞争排斥抵抗病原微生物的侵袭, 通过分析肠道菌群, 可了解凡纳滨对虾的健康状况^[5-7]。目前相关研究仅限于正常对虾肠道菌群, 且仅见于饲料添加剂、微生态制剂对肠道菌群的影响方面^[8-9], 关于特定病原对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响报道较少。本研究通过健康对虾与 AHPNS 病虾的肠道细菌群落比较, 研究 AHPNS 病虾的肠道菌群结构变化, 可以从肠道微生态调控的角度为该病的防控提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验对虾 3 份疑似 AHPNS 病虾样品

(BS1~BS3) 来源于江苏省如东市 3 处出现大规模对虾暴死的养殖场, 表现为肝胰腺萎缩, 空肠空胃, 濒死症状。对照样品来自相同养殖场同批正常对虾 (表 1), 样品采集后冷藏, 24 h 内带回实验室。每份样品取 6 只对虾个体, 测量体长并计算均值; 无菌操作分离对虾肠道, 清除内容物, 取 6 只对虾的肠道混合为一个样品, 灭菌生理盐水冲洗内表面后置于离心管中, 研磨成匀浆, -80 ℃ 冷冻备用。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL100 DNA marker、PMD19-T 克隆试剂盒和限制性内切酶为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。DNA 提取试剂盒 (3S DNA Isolation Kit V2.2)、DNA 胶回收试剂盒为上海博彩生物技术公司产品。

表 1 样品来源及其养殖状态

Table 1 The sample source and aquaculture condition

样品编号	样品来源	养殖状态	投苗时长 (d)	平均体长 (cm)
ZC1	江苏如东富盐村	全池健康正常	5	2.03
ZC2	江苏如东光荣村	全池健康正常	20	5.78
ZC3	江苏如东何丫村	全池健康正常	50	12.10
BS1	江苏如东富盐村	大规模死亡, 空肠空胃	5	1.99
BS2	江苏如东光荣村	大规模死亡, 空肠空胃	20	5.87
BS3	江苏如东何丫村	大规模死亡, 空肠空胃	50	12.21

1.1.3 引物的设计与合成 毒力基因 *PirA* 采用引物 AP3-F (5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3') 和 AP3-R (5'-GTGGTAATAGATTGTACAGAA-3')^[10] 扩增, 目的片段为 333 bp; 16S rRNA 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[11] 扩增, 目的片段为 1 500 bp; 使用通用引物 RV-M (CAGGAAACAGC-TATGAC) 与 M13-47 (CGCCAGGGTTTCCAGT-CACGAC) 扩增克隆片段。

1.2 方法

1.2.1 AHPNS 病虾的确认 分别称取 100 mg 解冻、匀浆的不同对虾肠道样品, 提取 DNA, 1% 琼脂

糖凝胶电泳检测, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以上述 DNA 为模板, 扩增 AHPNS 病原菌的毒力基因 *PirA*, 以 AHPNS 病原菌为对照。反应体系为 $25.00\text{ }\mu\text{l}$, 包括 $10\times$ PCR 缓冲液 $2.50\text{ }\mu\text{l}$, dNTPs mixture $2.00\text{ }\mu\text{l}$, 引物 (10 mmol/L) 各 $1.00\text{ }\mu\text{l}$, 模板 DNA $1.00\text{ }\mu\text{l}$, *rTaq* 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{l}$) $0.20\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察有无目标条带。

1.2.2 克隆文库的构建及限制性内切酶酶切分析
以上述 DNA 为模板, 扩增 16S rRNA。反应体系为 $25.00\text{ }\mu\text{l}$, 包括 $10\times$ PCR 缓冲液 $2.50\text{ }\mu\text{l}$, dNTPs mixture $2.00\text{ }\mu\text{l}$, 引物 (10 mmol/L) 各 $1.00\text{ }\mu\text{l}$, 模板 DNA $1.00\text{ }\mu\text{l}$, *rTaq* 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{l}$) $0.20\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳确认后切胶回收纯化。回收 PCR 产物按 TaKaRa PMD19-T 载体试剂盒说明书进行克隆, 将阳性克隆提取质粒后依照试剂盒说明书以引物 RV-M/M13-47 进行 PCR 扩增, PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h , 3% 琼脂糖凝胶电泳, 分析克隆子酶切图谱。以 Coverage (C) 评估所构建文库的库容, 分析微生物多样性。采用公式如下:

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$$

式中 N 为文库的克隆数, n_1 为文库中不重复序列的克隆数。

1.2.3 差异克隆子 DNA 测序以及比对分析 筛选的差异克隆子经上海生工生物工程技术有限公司测序, 所获序列通过 NCBI 数据库比对, 并上传至 NCBI 数据库。

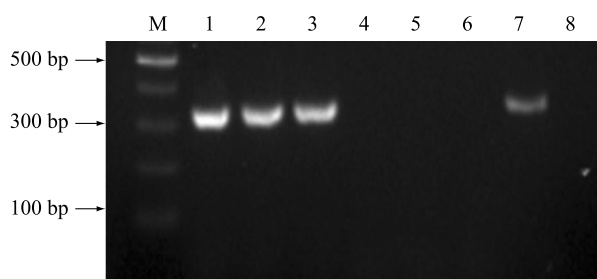
2 结果

2.1 病虾的确认结果

AP3 引物扩增的 PCR 产物电泳结果显示, ZC1、ZC2、ZC3 未检出 AHPNS 毒力基因。BS1、BS2、BS3 在 333 bp 大小处有明亮条带, 与目标条带大小一致 (图 1)。表明, BS1、BS2、BS3 肠道中携带 AHPNS 病原菌。

2.2 克隆文库的构建以及限制性内切酶酶切结果

对 6 份样品的 16S rDNA 的 PCR 产物进行分子克隆, 每份样品均挑选出 150 个阳性克隆子, 所有阳性克隆菌落用 RV-M/M13-47 引物 PCR 扩增, 产物



M: DNA 标准 DL100; 1、2、3 分别表示病虾样品 BS1、BS2、BS3; 4、5、6 分别表示正常对虾样品 ZC1、ZC2、ZC3; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照。

图 1 各样品的 AHPNS 毒力基因的 PCR 检测结果

Fig.1 PCR results for virulence genes of AHPNS in six samples

约为 1.7 kb , 6 份样品获得数目不一的阳性克隆。使用限制酶 *Msp* I 和 *Hae* III 将不同来源的阳性克隆菌落 PCR 产物进行酶切, 3 份正常对虾样品获得数目不一、条带不同的 RFLP 谱型, 3 个发病对虾样品却表现为单一的 RFLP 单带谱型 (见图 2、表 2)。表明, AHPNS 病虾的肠道菌群结构单一, 肠道多样性显著降低。

表 2 克隆及酶切结果统计

Table 2 The statistics of positive clones and enzyme digestion results

样品编号	克隆子数	阳性率 (%)	RFLP 谱型	克隆文库覆盖率 (%)
ZC1	123	82.0	16	87.8
ZC2	132	88.0	9	93.1
ZC3	126	84.0	6	95.2
BS1	135	90.0	1	99.2
BS2	122	81.3	1	99.1
BS3	112	74.6	1	99.1

ZC1、ZC2、ZC3 表示正常对虾样品; BS1、BS2、BS3 分别表示病虾样品。

2.3 差异克隆子 DNA 测序以及比对结果

经上海生工生物工程技术服务股份有限公司测序, 获得不同谱型的克隆子序列, 将相关序列上传 NCBI 数据库并取得相应序列号, 经 BLAST 比对, 获得最相似序列菌名。结果发现, AHPNS 发病对虾与健康对虾肠道菌群存在明显差异, 同时正常对虾在不同养殖期肠道菌群也存在一定差异。ZC1、ZC2、ZC3 的肠道菌群序列中分别有 16 个、9 个和 6 个与已知细菌 (属) 具有同源性 (表 3)。

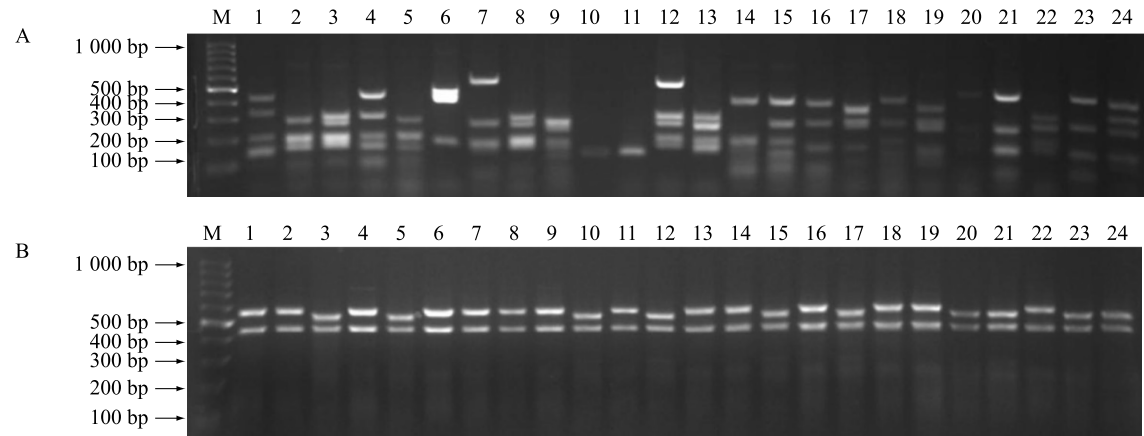


图 A,1~24:来源于 ZC1 样品部分阳性克隆 PCR 产物的酶切图谱;图 B,1~24:来源于 BS1 样品部分阳性克隆 PCR 产物的酶切图谱。以上酶切图谱均由 *Msp* I 消化所得。M:DNA marker DL100。

图 2 部分阳性克隆子的 RLFP 的电泳图谱
Fig.2 Partial results of RLFP analysis of 16S rDNA library

表 3 健康对虾肠道细菌 16S rRNA 基因 NCBI 比对结果

Table 3 NCBI alignment of 16S rRNA gene of intestinal bacteria in healthy shrimp

序列来源	差异代表序列	最相似序列	相似度 (%)	序列号	克隆数	类群
ZC1	ZC1-1	<i>Rhodobacterales</i> bacterium (FM180526.1)	98	/	14	α
	ZC1-2	<i>Vibrio campbellii</i> (KX534746.1)	99	MF872549	9	γ
	ZC1-3	Uncultured bacterium (FJ626907.1)	90	/	19	γ
	ZC1-4	Uncultured bacterium (GQ441254.1)	92	/	1	C
	ZC1-5	<i>Phaeobacter</i> sp. (KT185144.1)	93	/	13	α
	ZC1-6	<i>Nannochloropsis limnetica</i> (KC568459.1)	94	/	1	C
	ZC1-7	<i>Robiginitalea</i> sp. (KY780360.2)	97	MF872550	6	F
	ZC1-8	<i>Oceanicola</i> sp. (KU937121.1)	90	/	3	B
	ZC1-9	Uncultured <i>Amaricoccus</i> sp. (FJ543040.1)	92	MF872551	6	α
	ZC1-10	Uncultured <i>Planctomycetales</i> (EU812984.1)	95	MF872552	6	P
	ZC1-11	<i>Rheinheimera</i> sp. (KF746889.1)	92	/	14	γ
	ZC1-12	<i>Winogradskyella</i> sp. (JN594609.1)	93	MF872553	6	F
	ZC1-13	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium (GQ348700.1)	94	MF872554	4	V
	ZC1-14	<i>Planctomycete</i> (JF443763.1)	94	MF872555	3	P
	ZC1-15	<i>Ruegeria</i> sp. (AJ391197.1)	96	MF872556	4	α
	ZC1-16	<i>Mychonastes jurisii</i> (KT625411.1)	94	/	3	C
ZC2	ZC2-1	<i>Vibrio shilonii</i> (AY911392.1)	99	MF872557	18	γ
	ZC2-2	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. (CP021151.1)	99	MF872558	49	γ
	ZC2-3	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> (GQ249478.1)	98	MF872559	5	γ
	ZC2-4	<i>Shewanella</i> sp. (HG529988.1)	99	MF872560	17	γ
	ZC2-5	<i>Vibrio shilonii</i> (EU419916.1)	95	MF872561	7	γ
	ZC2-6	<i>Bulboplastis apyrenoidosa</i> (KY709209.1)	98	MF927573	3	C
	ZC2-7	Uncultured <i>cyanobacterium</i> (JF344683.1)	95	MF927574	1	P
	ZC2-8	Uncultured <i>Photobacterium</i> sp. (HE610319.1)	96	MF872562	14	γ
	ZC2-9	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i> (NR113624.1)	96	/	8	γ
ZC3	ZC3-1	<i>Acidovorax</i> sp. (GU086421.1)	99	MF872563	34	β
	ZC3-2	Uncultured <i>Azospira</i> sp. (JX576025.1)	96	MF872564	16	β
	ZC3-3	<i>Pseudomonas mendocina</i> (HM231168.1)	96	MF872565	52	γ
	ZC3-4	Uncultured <i>planctomycete</i> (FR714344.1)	98	MF872566	8	P
	ZC3-5	<i>Cyclotella</i> sp. (KJ958481.1)	97	/	5	C
	ZC3-6	<i>Brevundimonas</i> sp. (KU891843.1)	97	MF872567	11	α

ZC1、ZC2、ZC3 见表 2 注。

研究发现,ZC1 肠道菌群有 6 个门类:变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、黄杆菌门(Flavobacteria)、微疣菌门(Verrucomicrobia)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和蓝细菌门(Chloroplast)。其中变形菌门为优势类群, γ -变形细菌纲(Gamma-proteobacteria)占据 3 条差异序列, α -变形细菌纲(Alpha-proteobacteria)含有 4 条差异序列,两者的克隆数占据总克隆数的 64.2%。ZC2 仅含有 γ -变形细菌纲、浮霉菌门和蓝细菌门, γ -变形细菌纲含有 7 条差异序列,其克隆数占据总克隆数的 89.3%。ZC3 含有变形菌门(α -变形细菌纲、 β -变形细菌纲、 γ -变形细菌纲)、浮霉菌门和蓝细菌门。 β -变形细菌纲含有 2 条差异序列, α -变形细菌纲和 γ -变形细菌纲各含有 1 条差异序列。 α -变形细菌纲、 β -变形细菌纲和 γ -变形细菌纲的克隆数占据总克隆数的 8.7%、41.2% 和 39.7%。 β -变形细菌纲仅在 ZC3 肠道菌群中存在并且占据优势地位,在 ZC3 中未发现弧菌, γ -变形细菌纲为 3 份样品的共同优势类群。

健康对虾个体 ZC1 来源于养殖中后期,肠道菌

群的优势菌种为弧菌属(22.7%)、红杆菌属(21.9%)、莱茵海默氏菌属(11.4%)和浮霉菌属(7.3%)细菌;ZC2 对虾样品处于养殖前中期,优势菌株为发光杆菌属(47.7%)、弧菌属(18.9%)和希瓦氏菌属(12.9%)细菌;ZC3 样品采集自刚刚放苗 7 d,尚处于标粗阶段的幼虾,肠道菌群优势菌为假单胞菌属(41.2%)、食酸菌属(27.0%)和固氮螺菌属(12.7%)细菌。

3 份 AHPNS 病虾样品的对虾肠道中某一个属的细菌为绝对优势菌,NCBI 数据库比对结果均显示为弧菌属(表 4),选择与其同源性最高的 15 条基因序列构建系统发育树(图 3),发现 BS1-1、BS2-1、BS3-1 都与副溶血弧菌同源性最高,BS1-1、BS3-1 亲缘关系相近。因此,判定 BS1-1、BS2-1、BS3-1 都为副溶血弧菌。随着养殖时间的推移,健康对虾肠道微生物多样性呈现上升趋势,肠道优势菌也发生变化。处于不同生长阶段的 AHPNS 病虾肠道菌群多样性显著降低,副溶血弧菌成为肠道绝对优势菌。

表 4 AHPNS 发病对虾肠道细菌 16S rDNA 基因 NCBI 比对结果

Table 4 NCBI alignment of 16S rDNA gene of intestinal bacteria in *Litopenaeus vannamei* infected with AHPNS

序列来源	差异代表序列	最相似序列	相似度(%)	序列号	克隆数
BS1	BS1-1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CP022555.1)	98	MF872568	135
BS2	BS2-1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CP022555.1)	99	MF927575	122
BS3	BS3-1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KY985239.1)	99	MF927576	112

BS1、BS2、BS3 见表 2 注。

3 讨论

本研究发现病虾样品 BS1、BS2 与 BS3 肠道 DNA 中存在 *Pir^{mp}AB* 基因,BS1 肠道菌株与副溶血弧菌的同源性最高,副溶血弧菌是 AHPNS 的主要病原菌^[1-4]。BS2、BS3 的肠道菌株也都与副溶血弧菌同源性最高,BS1-1、BS2-1、BS3-1 均为弧菌属细菌,结合 AP3 检测结果,弧菌属细菌应为 AHPNS 病原菌。目前,一类携带特定致病基因 *Pir^{mp}AB* 的弧菌被普遍认为是导致对虾 AHPNS 发生的主要病原,该段基因编码一种二元蛋白毒素,导致对虾发生疾病^[12]。目前发现具有该基因的弧菌主要为副溶血弧菌^[2-4],另外哈维氏弧菌^[1]、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)^[13]和欧文斯氏弧菌(*Vibrio owensii*)^[14]也被报道。*Pir^{mp}AB* 基因位于一个 69 kb 的质粒上, Lee

等认为 pVA1 具有结合转移基因簇,可能是一个自主转移质粒,通过水平基因转移,整合进其他细菌基因组内^[15]。Han 等发现 *Pir^{mp}AB* 基因与一段插入序列组成一个复合转座子 Tn6264,可能通过质粒接合等方式将 Tn6264 转移至其他弧菌基因组中,并且迅速转移扩散^[12]。这些基因转移机制可能导致 AHPNS 迅速蔓延,病原菌种类不断增加,从最初发现的副溶血弧菌扩大至哈维氏弧菌、坎氏弧菌等其他弧菌。近年来,AHPNS 在全球的发病率越来越高,这可能与该基因的扩散有关。Sirikharin 等根据该毒力基因设计的 AP3 PCR 法是目前该病检测的主要方法^[10]。

研究发现,AHPNS 病虾的肠道菌群结构单一,弧菌属细菌为绝对优势菌。有研究结果表明,白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)仅仅

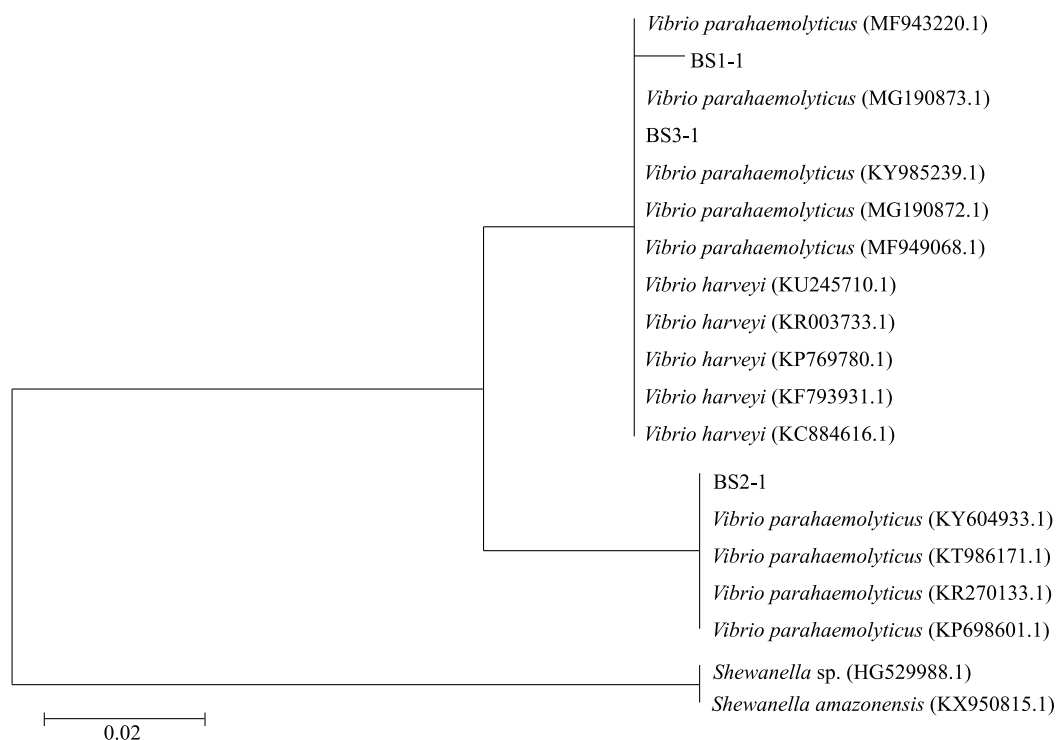


图3 AHPNS 病虾肠道绝对优势菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of absolute advantage intestinal bacterium of shrimp infected with AHPNS

使得肠道菌群中各种属细菌的数目和比例发生了改变,肠道菌群多样性并未发生明显变化,而 AHPNS 病原菌相较于 WSSV,对于对虾肠道菌群的影响更大,其造成肠道菌群结构崩溃,印证了 AHPNS 引发高死亡率的特点。*Pir^{AB}* 基因编码的二元蛋白毒素可插入感染对象的细胞膜上形成穿模孔洞,导致细胞内外渗透压的改变,使靶细胞损伤甚至死亡^[14]。本研究中病虾肠道近乎透明,肠道细窄,韧性消失,无内容物。AHPNS 病原菌的毒力极强,进入对虾肠道后,分泌毒素,对虾肠道细胞不断坏死脱落,肠道细菌可能随着坏死的肠黏膜和粪便一起排出体外,病虾肠道菌群结构被完全破坏。肠道菌群对于对虾的生长和抗病具有重要作用,堪称是对虾的另类“器官”,若肠道菌群结构被完全破坏,则对虾的消化和抗病能力受到显著影响。

虾类肠道菌群结构与其所处的生长阶段、生长环境以及健康状况有关^[16]。吴金凤等^[6]研究发现发病对虾肠道菌群多样性显著降低,孙振丽等^[17]通过高通量测序研究发现凡纳滨对虾肠道菌群与池塘底泥及水体菌群关系密切。水生动物通过摄食将环境微生物和藻类摄入肠道,某些细菌被排出体外,部

分细菌定殖于肠道。对虾养殖水体以及自然水体中的主要优势菌群为 α -变形细菌纲和 γ -变形细菌纲细菌,凡纳滨对虾肠道菌群的主要优势细菌类群为变形菌门和厚壁菌门细菌,主要包含弧菌属、假单胞菌属、发光杆菌属等细菌^[17-18]。本研究中健康对虾 ZC1、ZC2 样品为 20 日龄和 50 日龄的对虾群体,肠道菌群受水体菌群影响,优势菌为弧菌属、发光杆菌属、红杆菌属细菌,归属于 α -变形细菌纲和 γ -变形细菌纲。对虾肠道菌群的组成是动态变化的,不同生长阶段对虾肠道菌群的组成也有较大的区别。虾卵、糠虾与幼虾阶段的虾体内的优势菌群为红环菌科、柄杆菌目、伯克氏菌目、黄杆菌目、肠杆菌科、假单胞菌科细菌,弧菌属细菌为劣势菌^[19]。这与本研究的研究结果相近,ZC3 样品为幼虾,肠道中优势菌为假单胞菌属、食酸菌属、短波单胞菌属和固氮螺菌属细菌。在分类地位上,食酸菌属归属于伯克氏菌目,固氮螺菌属归属于红环菌科,短波单胞菌属则归属柄杆菌目。浮霉菌属细菌是肠道优势菌群,吴定心首次发现浮霉菌纲(Planctomycetacia)细菌为凡纳滨对虾肠道菌群优势菌,并认为厌氧氨氧化细菌来自该纲,对氮循环起到一定作用^[9]。弧菌属与发光

杆菌属是条件致病菌,当凡纳滨对虾受到氨氮等环境因子以及其他病原胁迫时,可能发生继发性感染,发生多种病原毒力叠加。

本研究采用PCR-RFLP法研究了急性肝胰腺坏死综合症对凡纳滨对虾肠道菌群的影响,结果发现,健康凡纳滨对虾肠道优势菌为弧菌属、红杆菌属、莱茵海默氏菌属、发光杆菌属、弧菌属等细菌,而凡纳滨对虾发生AHPNS后肠道菌群结构单一,肠道中弧菌属细菌为绝对优势细菌。

参考文献:

- [1] TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. [J]. Dis Aquat Org, 2013, 105(1): 45-55.
- [2] LA PEÑA L D, CABILLON N A, CATEDRAL D D, et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. [J]. Dis Aquat Org, 2015, 116(3): 251-254.
- [3] SOTO-RODRIGUEZ S A, GOMEZGIL B, LOZANOOLVERA R, et al. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(5): 1689-1699.
- [4] JOSHI J, SRISALA J, TRUONG V H, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus*, isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2014(428/429): 297-302.
- [5] OXLEY A P A, SHIPTON W, OWENS L, et al. Vacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis* [J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(2): 214-223.
- [6] 吴金凤,熊金波,王欣,等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. 应用生态学报, 2016, 27(2): 611-621.
- [7] 杨慧婷. 对虾肠道菌群动态平衡的免疫调控研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [8] 张盛静,赵小金,宋晓玲,等. 饲料添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll受体及溶菌酶基因表达及抗感染的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 846-854.
- [9] 吴定心. 微生物制剂对南美白对虾养殖体系微生态的影响及其与藻类关系的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [10] SIRIKHARIN R, TAENGCHAIYAPHUM S, SANGUANRUT P, et al. Characterization and PCR detection of binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. [J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): 219-220.
- [11] 范志宇,魏后军,仇汝龙,等. 一株新型家兔肠炎沙门氏菌的分离鉴定及防治[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1367-1371.
- [12] HAN J E, TANG K F J, ARANGUREN L F, et al. Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pir AB vp, (-) *V. parahaemolyticus*, and pir AB vp, (+) *V. campbellii*, strains [J]. Aquaculture, 2017, 470: 84-90.
- [13] DONG X, BI D, WANG H, et al. pirABvp-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-Affected pond possess highly similar pathogenic plasmids [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1859.
- [14] 蒋葛,沈辉,万夕和,等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征研究进展[J]. 动物医学进展, 2018(4): 87-91.
- [15] LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, et al. Correction for Lee et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. [J]. Proc Natl Acad Sci, 2015, 112(39): 798-803.
- [16] 李继秋,谭北平,麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 2006, 15(1): 109-113.
- [17] 孙振丽,宣引明,张皓,等. 南美白对虾养殖环境及其肠道细菌多样性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 594-605.
- [18] 张云鹏,朱立颖,肖朝耿,等. 南美白对虾体表与肠道细菌菌群结构的 DGGE 分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 218-224.
- [19] ZHENG Y F, YU M, LIU J W, et al. Bacterial community associated with healthy and diseased pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages [J]. Front Microbiol, 2017, 8(18): 1-11.

(责任编辑:陈海霞)