

基于高通量测序的不同养殖系统下凡纳滨对虾肠道和 水体中微生物的多样性*

Analysis of Aquaculture-water and Gut from *Fenneropenaeus chinensis* in Different Systems on Bacterial Diversity based on High-throughput Sequencing Technology

樊英, 王晓璐, 李乐, 盖春蕾, 于晓清, 叶海斌**, 刘洪军

FAN Ying, WANG Xiaolu, LI Le, GAI Chunlei, YU Xiaoqing, YE Haibin,
LIU Hongjun

(山东省海洋生物研究院, 山东省海水养殖重点实验室, 山东青岛 266104)

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

摘要:【目的】研究不同养殖系统对凡纳滨对虾肠道及水体微生物多样性的影响。【方法】以循环养殖系统和非养殖系统下凡纳滨对虾养殖水体及其肠道为研究对象, 在养殖 30 d 后采集样品, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序样品细菌 16S rRNA 基因 V3+V4 区, 通过 RDP11.3、Greengenes13.8、NCBI 16S Microbial 和 Customized database 等数据库进行分析, 阐述循环养殖系统的意义和微生物在其中的作用。【结果】养殖期间, 不同养殖系统凡纳滨对虾均正常存活。将原始序列优化后对 Clean 序列进行分析, 非循环系统下水体优质序列百分比约 81%, 肠道中约 89%; 循环系统下水体优质序列百分比为 92%, 肠道中为 94%。两种养殖系统下水体和肠道细菌在纲水平占绝对优势的是变形菌纲, 但各菌群丰度不同; 不同的 Alpha 指数显示出物种间的差异性; 通过系统发育树可以看出, 不同养殖系统改变了凡纳滨对虾生境中的物种及发育关系, 间接阐述微生物在养殖生境中的作用和意义。【结论】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。

关键词: 高通量测序 凡纳滨对虾 肠道菌群 微生物多样性

中国分类号: S966.12, S917.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2017)04-0261-07

Abstract: 【Objective】To study the effect of different aquaculture system on bacterial diversity of water and gut from *Fenneropenaeus chinensis*. 【Methods】Taking aquaculture-water and gut of *Fenneropenaeus chinensis* under both the recirculation system and the non-culture

system as the research object, samples were collected after fed 30 d. The bacterial 16S rRNA gene V3+V4 region was sequenced using the Illumina MiSeq high-throughput sequencing sample and analyzed by RDP11.3, Greengenes13.8, NCBI16S Microbial and Customized Database to elucidate the significance of circulatory aquaculture system and the role of microorganisms. 【Results】*Fenneropenaeus chinensis* were survived normally in different culture systems dur-

收稿日期: 2017-07-10

作者简介: 樊英 (1980—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事水产动物养殖及病害防控研究, E-mail: fy_fy123@126.com.

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

** 通信作者: 叶海斌 (1976—), 男, 副研究员, 主要从事水产动物养殖及病害防治研究, E-mail: yehaibin@263.net.

ing the cultivation. After the original sequence was optimized, the Clean sequence was analyzed. The percentage of high quality sequences in the non-circulatory system was about 81% and about 89% in the gut. The percentage of high quality sequence in the circulatory system was 92% and 94% in the gut. The Proteobacteria of the water bodies and gut bacteria in the two aquaculture systems were at an absolute advantage, but the abundance of each group was different. The different Alpha-varieties showed the differences among the species. According to the phylogenetic tree, different culture systems had changed the species and developmental relationships of *Fenneropenaeus chinensis* in habitats and indirectly explained the role and significance of microorganisms in culture habitats. **【Conclusion】**The high-throughput sequencing reveals differences and diversity of microbial flora in different culture systems and is instructive to the actual culture of *Fenneropenaeus chinensis*, which is of great significance for elucidating the relationship between microorganisms and related diseases in the aquaculture.

Key words: high-throughput sequencing, *Fenneropenaeus chinensis*, gut microorganism, bacterial diversity

0 引言

【研究意义】微生物是宿主自身和生长环境中存在的一种分解代谢类群,在机体健康生长过程中起关键性作用,是当今研究领域中不可或缺的部分^[1-2]。对于养殖动物机体而言,肠道是微生物寄生的场所,细菌通过特定的方式黏附在肠黏膜上,肠道内的理化性质和营养物质的种类客观决定所黏附共生肠道微生物的结构和功能,调控着机体自身的代谢系统及免疫系统。研究表明,生态环境的差异化,不仅可以满足宿主对营养免疫的需求,又能使细菌菌群优势种在结构组成上既有共性又存在着明显的差异,最终实现应用效果^[3-5]。不同养殖方式下,养殖水体以及养殖动物肠道中微生物有所不同,从而表现出多样性。微生物的多样性不仅包括所有的生命形式、生态系统和过程,还包括有关微生物在遗传、分类和生态系统水平上的联系^[6-7]。因此,从微生物多样性角度探讨分析不同养殖系统的作用具有重要意义。**【前人研究进展】**在实际养殖过程中,外界因素会从不同方面对养殖动物健康、养殖效益等产生负面影响,如水体中非离子氨、亚硝酸氮等浓度较高时,养殖动物活力会下降且生长缓慢,甚至死亡^[8-9];投喂大量饵料时,仅有约30%被养殖对象所利用,剩余70%则以残饵、粪便等形式落入养殖环境中,从而影响养殖水体质量、微生物菌群结构以及生态代谢系统等。近年来,循环水养殖系统以众多优点被水产养殖业所认可。Davidson等^[10]采用循环水养殖系统探究其对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生长的影响;Drengstig等^[11]在循环水养殖系统中试验欧洲龙虾(*Homarus gammarus* L.)的生长响应,同样产生了较好的效果;谭建等^[12]研究

证实循环水养殖凡纳滨对虾具有各种优势。宏基因组测序,是对特定环境(或者特定生境)样品中所有的微生物基因组序列进行高通量测定,用以分析微生物群体的基因组成及功能,解读微生物群体的多样性与丰度,探求微生物与环境、宿主之间的关系,发掘和研究新的以及特定功能基因。相对于传统的生态学方法来说,该技术目前应用较多,且能更灵敏、准确地反映出样品中细菌群落的真实情况^[13-15]。如薛明等^[14]通过高通量测序技术研究分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征,讨论微生物菌群在病害防控及维持健康养殖稳态中的重要意义;杨硕^[15]采用高通量测序技术分析凡纳滨对虾肠道菌群和水体菌群特征,讨论菌群变化的分析利用。**【本研究切入点】**凡纳滨对虾在我国沿海以及内地均有养殖,对其也有众多的研究^[16-20]。为了解不同养殖系统下凡纳滨对虾水体和肠道中微生物菌群结构发生的变化,以微生物多样性研究为基础,利用高通量测序技术进行分析,探讨其重要性。**【拟解决的关键问题】**利用高通量测序对不同微生物 V3+V4 区域进行分析,研究两种循环系统下凡纳滨对虾养殖水体以及肠道内微生物的组成,揭示凡纳滨对虾养殖系统中细菌群落结构的某些特征,为相关病原菌的分子检测及实际养殖过程提供参考,为进一步探究凡纳滨对虾生态养殖奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验对象

健康、规格一致的凡纳滨对虾(*Penaeus 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。养殖池大小均为25 m²,随机放入试验凡纳滨对虾500尾/m²。

1.2 试验设计及养殖条件

试验共设 2 组,对照组(流水系统)与试验组(自行设计循环系统),每组 3 个平行。

对照组(流水系统):流水养殖模式中养殖池面积 25 m²,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,养殖废水直接排放至废水收集池,不进行循环利用。

试验组(循环系统):循环水养殖模式养殖池面积 25 m²,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,由微滤机去除残饵、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)对废水中氨氮、亚硝酸盐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。

试验水源为地下水,水温(25±1)℃,pH 值为 7.2~7.8,溶氧为 5.5~6.5 mg/L,氨氮小于 0.4 mg/L。

试验过程中正常管理,24 h 充气,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;养殖时间共 30 d。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 所示。

表 1 基础饲料营养成分

Table 1 Nutrient ingredients of basal diet

营养成分 Nutrient ingredients	含量 Mass fraction (%)	营养成分 Nutrient ingredients	含量 Mass fraction (%)
粗蛋白质 Crude protein	≥44.0	钙 Calcium	≤5.0
粗脂肪 Crude fat	≥4.0	总磷 Total phosphorus	≥1.2
粗纤维 Crude fiber	≤6.0	赖氨酸 Lysine	≥2.2
粗灰分 Crude ash	≤16.0	水分 Moisture	≤11

1.3 样品收集

试验 30 d 后分别从不同试验组别中随机取样,每池选取 5 点位置(四角和中间)分别获取样品后混合均匀,待后续试验。每点取水样量为 5 L,混合后用 0.45 μm 无菌微孔膜进行抽滤,获得微生物菌群样品,-80℃ 保存备用。凡纳滨对虾每点取 20 尾,冰上无菌操作获取肠道内容物^[21],混合,-80℃ 保存备用。

1.4 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

利用 QUAGEN 试剂盒分别提取水体和肠道细菌基因组总 DNA,扩增高可变区(引物 319F、806R,参考陈冠舟等^[22]方法);一轮扩增之后,在正反向引物两端分别加上不同的 adapters 和 barcodes,再进行扩增;产物纯化之后进行测序。PCR 产物用 AxyPrep™ Mag PCR Normalizer 做归一化处理。

1.5 数据分析

本试验针对 Illumina MiSeq 2 x 300bp paired-end 测序数据进行分析。分析数据库包括 RDP11.3、Greengenes13.8、NCBI 16S Microbial 和 Customized database N/A。分析内容包括原始数据优化及有效优质序列统计、OTU (Operational Taxonomy Unit) 聚类统计、OTU 比较 venn 图、Alpha 多样性指数(Shannon、Simpson、Chao1)分析、分类丰度分析、物种差异分析及(Un)weighted Uni-frac PCoA 分析、(Un)weighted Unifrac Tree 分析。

原始数据优化及有效优质序列统计: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,进行有效序列和优质序列的统计。

OTU 聚类统计: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。OTU 比较 venn 图可用于统计多组样品中所共有和独有的 OTU 数目,可以比较直观地表现环境样品的 OTU 数目组成相似性及特异性。

Alpha 多样性又为生境内的多样性(Within-habitat Diversity),通常用于度量群落生态中物种的丰富度,是反映丰富度和均匀度的综合指标。本研究基于 OTU 的结果,计算样品 Alpha 多样性,包括 Shannon、Simpson、Chao1 指数。

物种分类丰度分析,是分析多样性的另一种方式。在相似度为 0.97 的情况下,从纲水平上对不同系统中菌群分布的均匀度进行统计。

物种系统发育进化树,根据数据库分析描述各种生物之间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 原始数据有效优质序列统计

从表2中可看出,循环系统处理之后凡纳滨对虾养殖水体环境和肠道中优质序列占有有效序列的比

表2 有效优质序列统计

Table 2 Statistics of vail and superior sequence

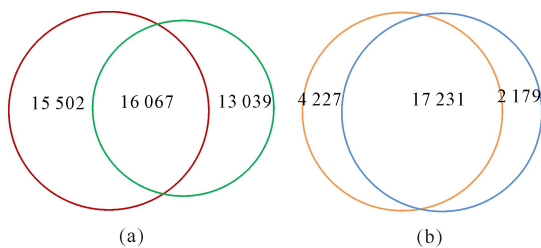
组别 Groups	有效序列数 Valid sequence No.	优质序列数 Superior sequence No.	优质序列百分比 Proportion of superior sequence (%)
水体-对照组 Water-control	41 969±0.22	34 088±0.3 ^a	81.22±0.05 ^a
水体-试验组 Water-experimental	45 815±0.17	42 149±0.06 ^b	92.00±0.11 ^b
肠道-对照组 Gut-control	32 788±0.13	29 403±0.23 ^a	89.68±0.18 ^a
肠道-试验组 Gut-experimental	36 370±0.07	34 297±0.02 ^b	94.30±0.03 ^a

注:同列数据肩标表明,不同小写字母代表差异性不同($P < 0.05$)

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)

2.2 OTU 聚类统计分析

不同循环系统对于养殖水体环境和养殖对虾肠道微生物多样性产生显著影响。在97%相似性水平上统计,非循环系统中水体样品 OTU 数量为31 569,凡纳滨对虾肠道样品中 OTU 数量为21 458;而循环系统中水体样品 OTU 数量为29 106,凡纳滨对虾肠道样品中 OTU 数量为19 410(图1)。从不同养殖系统中样品的共有和独有 OTU 数目可看出,循环系统更能优化生境中的菌群结构。



不同养殖系统下水体(a)和肠道(b)环境中的 OTU 分析;红色和橙色环为非循环系统对照组,绿色和蓝色环为循环系统试验组,中间为共有部分

OTU analysis of water in different aquaculture systems; The red and orange rings are control groups in a non-circulatory system, the green and blue rings are experimental groups in a circulatory system, the part in the middle is for the common

图1 基于 OTU 数量的 veen 图

Fig. 1 Veen diagram based on the number of OTU

2.3 Alpha 多样性指数

Alpha 多样性反映了不同养殖系统下水体环境

例明显增加($P < 0.05$),循环系统可有效优化生境中的微生物生态环境。而且,测序得到的有效序列与优质序列质量很高,可以达到后续微生物多样性的相关分析要求(检测序列长度在300~500 bp)。

和肠道中的物种丰富度以及差异性。指数越高,物种多样性越高;数值越大,物种越多。在循环系统下,由于特殊的系统结构和处理,生境中物种多样性及分布均匀度均得到优化,可能是在循环过程中除去了一些不必要的杂菌系列(表3)。

表3 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index

组别 Groups	Shannon	Simpson	Chao1
水体-对照组 Water-control	4.72	0.87	15 764.53
水体-试验组 Water-experimental	4.68	0.88	11 878.50
肠道-对照组 Gut-control	6.30	0.91	17 342.51
肠道-试验组 Gut-experimental	7.18	0.95	13 755.78

2.4 物种分类丰度分析

不同养殖系统影响凡纳滨对虾生境中物种的丰富度及分布情况。从类别上分析,不同样品中细菌序列数为100.0%,均未测序到古菌序列。从纲水平上,循环养殖系统试验组凡纳滨对虾肠道优势菌为蛋白菌门- α -变形菌纲,丰度达57.9%(对照组为38.2%);其次为厚壁菌门-芽孢杆菌纲,丰度为23.9%(对照组为29.2%);再次为拟杆菌门-黄杆菌纲(3.5%)、放线菌门-放线菌纲(1.3%)。而循环

水试验组养殖水体中优势菌为 α -变形菌纲,丰度达 36.9%(对照组为 23.8%), γ -变形菌纲丰度为 18.3%(对照组为 47.3%);其次是黄杆菌纲(16.4%)和放线菌纲(6.6%)。循环养殖系统中凡纳滨对虾肠道和养殖水体中物种丰度相对不同,但也共有一些优势菌纲(表 4)。

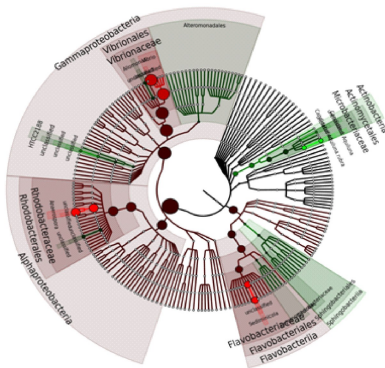
2.5 物种系统发育分析

如图 2 所示,非循环养殖系统水体样品中丰度较高的是 γ -变形菌纲、弧菌纲、红细菌目和黄杆菌目,变形菌纲和弧菌纲进化关系较近;而循环养殖系统水体样品中丰度较高的是 α -变形菌纲,其次是 γ -变形菌纲。两种循环系统中肠道微生物的丰度及关系相似,但非循环系统肠道样品中放线菌纲相对黄杆菌纲丰度高,循环系统中黄杆菌比放线菌丰度高。

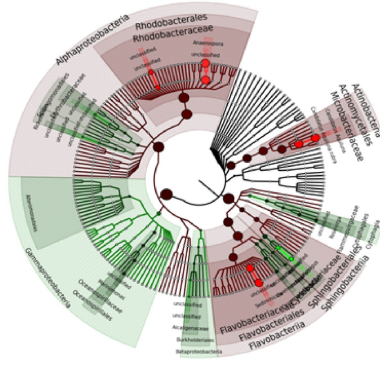
表 4 丰度统计分析

Table 4 Statistics and analysis of abundance

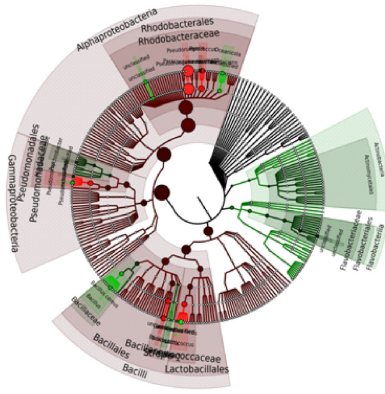
菌名 Bacteria	水体- 对照组 Water- control (%)	水体- 试验组 Water- experi- mental (%)	肠道- 对照组 Gut- control (%)	肠道- 试验组 Gut- experi- mental (%)
α -变形菌纲	23.8	36.9	38.2	57.9
Alpha-Proteobacteria	23.8	36.9	38.2	57.9
γ -变形菌纲	47.3	18.3	24.1	10.9
Gamma-Proteobacteria	47.3	18.3	24.1	10.9
β -变形菌纲	0.5	0.2	0.2	0.1
Beta-Proteobacteria	0.5	0.2	0.2	0.1
芽孢杆菌纲 Bacilli	0.1	0.9	29.2	23.9
梭菌纲 Clostridia	0.1	0.1	0.3	0.6
黄杆菌纲 Flavobacteriia	26.6	16.4	1.3	3.5
放线菌纲 Actinobacteria	21.9	6.6	3.1	1.3
疣微菌纲 Verrucomicrobiae	0.1	0.6	0.4	0.9
嗜纤维菌纲 Cytophagia	2.7	0.1	0.1	0.0
鞘脂杆菌纲 Sphingobacteriia	1.7	2.5	0.0	0.1



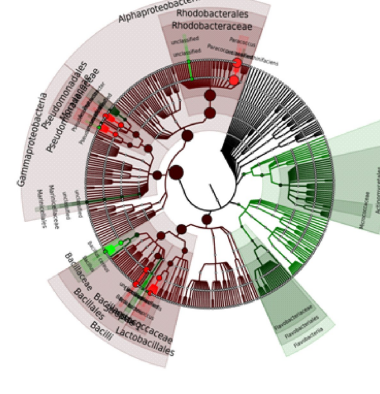
(a)非循环系统对照组水体样品
Water samples of a control group in a non-circulatory system



(b)循环系统试验组水体样品
Water samples of an experimental group in a circulatory system



(c)非循环系统对照组肠道样品
Gut samples of a control group in a non-circulatory system



(d)循环系统试验组肠道样品
Gut samples of an experimental group in a circulatory system

环形部分的文字为分类等级,由内到外分类等级为由低到高。节点大小表示丰度高低,绿色覆盖区域表示低丰度,红色覆盖区域表示高丰度

The characters in the ring are classification, the grades from inside to outside are from low to high. Nodes indicate abundance, green coverage area indicates low abundance, red coverage area indicates high abundance

图 2 不同样品中物种系统发育分析

Fig. 2 Phylogeny analysis of different sample species

3 讨论

有关对虾养殖过程中环境或宿主中可培养微生物与其养殖病害相关性早有研究^[23],但从微生物角度通过分子技术手段分析水体环境或宿主自身肠道菌群结构变化的报道相对较少。肠道微生物及其菌群结构在动物生长过程中具有重要作用,对虾肠道微生物与对虾营养代谢、能量平衡、免疫防御和胃肠道发育等密切相关,是维持对虾生长过程中肠道内环境稳定的重要因素。近几年高通量测序技术飞速发展,突破传统分析技术上的局限性,能更灵敏地探测环境内丰富的微生物多样性,可实现宏基因组水平上多重样品间的比较分析,扩大微生物相关研究的广度和深度^[24]。以往研究发现,变形菌门是养殖海水或高盐湖泊环境中最主要的细菌群体之一^[25-26],本研究分析结果也反映了这一规律,在不同养殖系统下水体中优势菌群为变形菌纲,其中 α 纲和 γ 纲丰度较高,该结果也与 Stevens 等^[26]的研究结果一致。核心微生物在正常生长环境下能影响和决定宿主自身微生物的组成、群落结构并维持群落平衡^[27],且在一定水平上阻止或防御外源生物的侵犯。不同养殖环境、不同养殖对象,其核心微生物的丰度不同,本研究结果显示循环系统可增强核心菌群的丰度,优化养殖生态环境,一定程度上决定养殖对象的健康,进而影响养殖效益。凡纳滨对虾养殖过程中存在潜在的致病菌,循环系统的优势在于改善优势菌的丰度,抑制有害菌的定植,从而创造更加良好的生长环境。

本研究所用循环水养殖系统经过严格筛选,在养殖池及生物净化池中循环流动,从而优化水体中的饵料、粪便及水体中有害生物等外界因素。生物净化池内固定净化水质的有益菌,在生长代谢过程中可抑制水体中氨氮或亚硝酸氮的增加,亦可能与水体中不利于养殖动物生长的有害菌争夺营养,间接预防疾病的发生,最终营造良好的生长环境。而且,从测序结果看,循环系统改善水体中微生物菌群结构,增强优势菌丰度,并进一步改善凡纳滨对虾自身肠道菌群结构,故循环水养殖系统与传统养殖模式相比具有节约养殖用水、养殖效果好等一系列优点,符合建设节约型社会的要求。

4 结论

本研究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。循环水养殖系统优化

凡纳滨对虾养殖水体微生物环境,改善凡纳滨对虾自身肠道微生物结构及多样性,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。

参考文献:

- [1] 高权新,吴天星,王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报,2010,22(3):519-526.
GAO Q X, WU T X, WANG J B. Advance in research on symbiotic relationship between intestinal bacterial and their host[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(3): 519-526.
- [2] INGERSLEV H C, VON GERSDORFF JØRGENSEN L, STRUBE M L, et al. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type[J]. Aquaculture, 2014, 424/425: 24-34.
- [3] 李存玉,徐永江,柳学周,等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析[J]. 水产学报,2015,39(2): 245-255.
LI C Y, XU Y J, LIU X Z, et al. Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond-and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 245-255.
- [4] 李玉宏. 养殖对虾肠道微生物区系的特征与功能[D]. 上海:上海海洋大学,2013.
LI Y H. The characteristic and function research on the intestinal microflora of shrimp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [5] WANG X H, LI H R, ZHANG X H, et al. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2000, 30(3): 493-498.
- [6] 孙昌魁,冯静,马桂荣. 海洋微生物多样性的研究进展[J]. 生命科学,2001,13(3):97-99.
SUN C K, FENG J, MA G R. The progress of studies on marine microorganisms diversity[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2001, 13(3): 97-99.
- [7] DYHRMAN S T, AMMERMAN J W, VAN MOOY B A S. Microbes and the marine phosphorus cycle[J]. Oceanography, 2007, 20(2): 110-116.
- [8] 夏苏东,李勇,王文琪,等. 养殖自污染因子对虾蟹健康的影响及其机理与控制[J]. 水产科学,2009,28(6): 355-360.
XIA S D, LI Y, WANG W Q, et al. The mechanism and control of self-pollution factors affecting health of prawn and crab[J]. Fisheries Science, 2009, 28(6): 355-

- 360.
- [9] REDDY-LOPATA K, AUERSWALD L, COOK P. Ammonia toxicity and its effect on the growth of the South African abalone *Haliotis midae* Linnaeus [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 678-687.
- [10] DAVIDSON J, GOOD C, WELSH C, et al. Abnormal swimming behavior and increased deformities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems [J]. *Aquacultural Engineering*, 2011, 45(3): 109-117.
- [11] DRENGSTIG A, BERGHEIM A. Commercial land-based farming of European lobster (*Homarus gammarus* L.) in recirculating aquaculture system (RAS) using a single cage approach [J]. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 14-18.
- [12] 谭建, 罗坤, 栾生, 等. 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 [J]. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(4): 63-70.
- TAN J, LUO K, LUAN S, et al. Preliminary application of the recirculating aquaculture system in *Litopenaeus vannamei* breeding [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(4): 63-70.
- [13] 李祎, 郑伟, 郑天凌. 海洋微生物多样性及其分子生态学研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(4): 655-668.
- LI Y, ZHENG W, ZHENG T L. Advances in research of marine microbial diversity and molecular ecology [J]. *Microbiology China*, 2013, 40(4): 655-668.
- [14] 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.
- [15] 杨硕. 凡纳滨对虾肠道菌群分析及其利用 [D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- YANG S. Analysis and utilization of intestinal flora in *Litopenaeus vannamei* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2016.
- [16] 张吕平, 胡超群, 罗鹏, 等. 抗生素对于对虾苗池水体细菌区系的影响 [J]. *应用生态学报*, 2009, 20(10): 2551-2557.
- ZHANG L P, HU C Q, LUO P, et al. Effects of antibiotics on bacterial community in shrimp hatchery system [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(10): 2551-2557.
- [17] WEN C Q, XUE M, LIANG H F, et al. Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173(1/2): 84-91.
- [18] 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 31-38.
- LUO P, HU C Q, ZHANG L P, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in marine *Litopenaeus vannamei* culture system [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 31-38.
- [19] 盖春蕾, 张元发, 叶海斌. 凡纳滨对虾体内大黄苷的药代动力学特征 [J]. *广西科学院学报*, 2016, 32(4): 282-287.
- GAI C L, ZHANG Y F, YE H B. Pharmacokinetic characteristics of rhein in the body of *Penaeus vannamei* [J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2016, 32(4): 282-287.
- [20] 易湘茜, 孙恢礼, 潘剑宇. 凡纳滨对虾生命周期环境影响模型分析评价研究 [J]. *广西科学*, 2014, 21(3): 306-312.
- YI X X, SUN H L, PAN J Y. The evaluation of the model of life cycle assessment (LCA) in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Guangxi Sciences*, 2014, 21(3): 306-312.
- [21] 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.
- [22] 陈冠舟, 张白鹭, 纪梦梦, 等. 高通量测序探究啮食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫的肠道菌群结构 [J/OL]. *微生物学通报*, (2017-06-06) [2017-08-21]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1996.Q.20170606.1242.006.html>.
- CHEN G Z, ZHANG B L, JI M M, et al. Gut microbiota of polystyrene-eating mealworms analyzed by high-throughput sequencing [J/OL]. *Microbiology China*, (2017-06-06) [2017-08-21]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1996.Q.20170606.1242.006.html>.

- Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2016, 11(11): 1497-1499.
- [32] 张智华. 梅国强运用柴胡类方治疗妇科疾病经验[J]. 中医药临床杂志, 2014, 26(2): 135-136.
ZHANG Z H, Mei Guo-qiang treatment of gynecological diseases of TCM clinical experience[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 26(2): 135-136.
- [33] 闫军堂, 刘敏, 赵伟鹏, 等. 王庆国教授治疗更年期综合征经验[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(6): 421-423.
YAN J T, LIU M, ZHAO W P, et al. Professor WANG Qing-guo's clinical experiencer of treating rheumatoid arthritis[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 34(6): 421-423.
- [34] 杨启瑞. 小柴胡汤治愈酉时昏睡一则[J]. 山西中医, 1992, 8(2): 25.
YANG Q R. Item one: Xiao Chaihu Tang cures exan-
imation in You Period(From 17:00 to 19:00)[J].
Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 1992,
8(2): 25.
- [35] 林素财, 张银娇. 柴葛解肌汤治疗小儿顽固性发热临
证举隅[J]. 中医药通报, 2009, 8(2): 51-52.
LIN S C, ZHANG Y J. Samples of children with in-
tractable fever for clinical application of Chaige Jieji
decoction[J]. Traditional Chinese Medicine Journal,
2009, 8(2): 51-52.
- [36] 陈亚双, 孙世伟. 柴胡的化学成分及药理作用研究进
展[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(3): 630-633.
CHEN Y S, SUN S W. The chemical components and
pharmacologic action research situation of *Radix
Bupleuri* [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2014, 27
(3): 630-633.
- [37] 元艺兰. 中药炮制与临床[J]. 现代医药卫生, 2009, 25
(7): 1075-1076.
YUAN Y L. Chinese traditional medicine
processing & clinic [J]. Journal of Modern
Medicine & Health, 2009, 25(7): 1075-1076.

(责任编辑:米慧芝)

(上接第 267 页 Continue from page 267)

- [23] VANDENBERGHE J, VERDONCK L, ROBLESAR-
OZARENA R, et al. Vibrios associated with
Litopenaeus vannamei larvae, postlarvae, broodstock,
and hatchery probionts[J]. Applied and Environmen-
tal Microbiology, 1999, 65(6): 2592-2597.
- [24] WU L Y, WEN C Q, QIN Y J, et al. Phasing amplicon
sequencing on Illumina Miseq for robust environmen-
tal microbial community analysis[J]. BMC Microbiol-
ogy, 2015, 15: 125.
- [25] DEMERGASSO C, CASAMAYOR E O, CHONG G,
et al. Distribution of prokaryotic genetic diversity in
athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern
Chile[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(1):
57-69.
- [26] STEVENS H, STÜBNER M, SIMON M, et al. Phy-
logeny of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* from oxic
habitats of a tidal flat ecosystem[J]. FEMS Microbi-
ology Ecology, 2005, 54(3): 351-365.
- [27] SHADE A, HANDELSMAN J. Beyond the Venn dia-
gram: The hunt for a core microbiome[J]. Environ-
mental Microbiology, 2012, 14(1): 4-12.

(责任编辑:米慧芝)